pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 1, pp. 100~104 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.1.100

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

Research note

AGS 세포주에서 트랜스 신남알데하이드의 세포 사멸 유도

이선이[1,2] · 정주희[1,2]*
[1]덕성여자대학교 약학대학
[2]덕성여자대학교 덕성혁신신약센터

trans-Cinnamaldehyde-Induced Apoptosis in AGS Cells

Sunyi Lee[1,2], Joohee Jung[1,2]*
[1]College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul, Korea
[2]Duksung Innovative Drug Center, Duksung Women's University, Seoul, Korea

(Received January 20, 2021/Revised January 28, 2021/Accepted February 1, 2021)

ABSTRACT - *trans*-Cinnamaldehyde (TCA), as one of the active ingredients in cinnamon, has been reported to have antiviral, antibacterial and antifungal effects as well as anti-cancer effects in several cancer cell lines. However, reports of TCA in gastric cancer are rare, and its mechanism is unclear. In this study, we investigated the anti-proliferative effect of TCA and its mechanism in gastric cancer AGS cells. TCA dose-dependently inhibited the cell viability of AGS cells. Our results suggested that TCA induces apoptosis through changes in cell morphology. To elucidate its mechanism, we investigated the expression level of apoptosis-related proteins. TCA induced the expression of p53 and Bax proteins, and then increased the cleaved caspase 9 and cleaved PARP. These results indicated that TCA triggers apoptosis via p53 pathway in AGS cells. Our results suggested that TCA might be a new anticancer drug candidate for gastric cancer.

Key words : trans-cinnamaldehyde, Gastric cancer AGS cell, Apoptosis

지난 수십 년간 연구자들의 노력으로 위암의 생존율을 지속적으로 증가시키고는 있으나, 아직까지도 발생률 및 사망률이 높은 암종이다[1]. 2018년 보고에 따르면, 위암은 세계에서 5번째로 빈번하게 발병하는 암이며, 주요 암 사망 원인으로 3위에 해당하였다[2]. 따라서, 위암을 극복할 수 있는 효과적인 치료방법이 요구되고 있다. 항암요법으로는 수술, 약물치료, 방사선치료 등이 개발되었으나[3], 각각 환자에게 적용하는데 제한점이 있다. 특히, 화학적 약물 치료는 구토발생, 구내염, 시각변화, 메스꺼움, 피부 반응 및 변비 등의 부작용이 보고되었으며, 이는 환자의 삶의 질을 낮추므로 문제가 되고 있다[4]. 따라서, 부작용을 경감시키면서 항암작용을 갖는 천연유래 물질에 대한 평가에 관심이 집중되고 있다.

트랜스 신남알데하이드(*trans*-cinnamaldehyde, TCA) (Fig. 1)는 계피에서 추출한 활성 성분으로 알려져 있으며, 오랫동안 요리 및 산업에서 천연 향신료로 사용되어 왔다. TCA는 계피 특유의 향을 나타내는 물질로, 계피 잎에서 1-5%, 껍질에서 65-80%를 차지하고 있다**.** TCA의 생리활성으로는 항바이러스, 항균 및 항진균 작용있으며[5,6] 항균작용으로 위암의 원인으로 잘 알려진 *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과가 우수하다고 보고되어있다[7]. 또한, 항산화 작용이 대표적으로 알려져 있다. 또한 TCA는 유방암 MDA-MB-231 세포에서 항산화 작용[5], 간암 세포주에서 JAK2-STAT3/STAT5신호전달[8], 비소세포폐암 세포주에서 Wnt/β-catenin 경로 조절[9], 대장암 세포주에서 PI3K/Akt 신호전달[10]을 통해 암세포 증식을 억제하였다는 보고도 있다. Milani 등[11]의 연구에서 TCA와 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate)의 병용처치가 세포생존율을 감소를 증가시킨다고 보고한 바 있다. 이와 같은 보고들을 토대로, 본 연구에서는 TCA가 위암 AGS 세포주에서 암세포 증식 억제 작용을 평가하고, 그 작용 기전을 알아보았다.

*Correspondence to: Joohee Jung, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea
Tel: +82-2-901-8731, Fax: +82-2-901-8386
E-mail: joohee@duksung.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

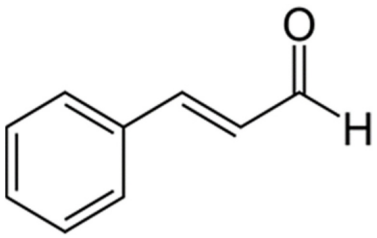

Fig. 1. Chemical structure of *trans*-cinnamaldehyde.

Materials and Methods

세포 배양

인간 위암 AGS세포주(KCLB No. 21739)는 한국세포주은행에서 분양받았다. AGS세포주는 RPMI-1640배지(GenDEPOT, Katy, TX, USA)에 10% FBS (GenDEPOT), 1% penicillin-streptomycin (GenDEPOT)을 첨가한 혼합 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

MTT assay

96-well plate의 각 well에 5×10^3-1×10^4 개의 AGS세포를 접종하고, 24 시간 동안 배양하였다. 단계 희석한 TCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 24 및 48 시간 동안 세포에 처리한 후, MTT 시약(Sigma-Aldrich) 10 μL를 첨가하고 37°C에서 4 시간 동안 반응시켰다. 배지는 버리고 DMSO (Sigma-Aldrich) 100 μL를 첨가하여 차광한 상태로 37°C에서 30 분간 처리하였다. Microplate reader (Infinite M200 PRO, TECAN, Zurich, Switzerland)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율을 다음과 같이 계산하였다[12].

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{TCA를 처리한 세포의 흡광도 - blank})}{(\text{대조군 세포의 흡광도 - blank})} \times 100$$

Cell morphology

AGS세포에 100 μM TCA를 처리 또는 용매만 처리(대조군)하여 24 시간 동안 배양한 후, PBS (Gibco, Grand Island, NY, USA)로 치환하고 바로 세포 형태의 변화를 현미경(Nikon ECLIPSE TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) 40배율로 관찰하였다.

Western blot analysis

AGS세포를 TCA (100 μM)로 처리한 후 24시간 동안 배양한 후, protease inhibitor (GenDEPOT)와 phosphatase inhibitor (Roche, Basel, Switzerland)를 넣은 RIPA 완충액 (GenDEPOT) 처리하여 4°C에서 15 분 동안 반응시킨 후 cell scraper (SPL life science, Pocheon, Korea)를 사용하여 용해된 세포를 모았다. 용해된 세포는 4°C 원심분리기 (Labogene 1730R, Seoul, Korea)에서 14,000 rpm, 15 분 동안 원심분리하여 상층액을 취했다. 총 단백질은 BCA assay kit (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 농도를 측정하였다. 10-12% SDS-PAGE로 단백질을 분리하고, semi-dry electro blotter (Peqlab, Erlangen, Germany)를 이용하여 PVDF membrane (Millipore, Burlington, MA, USA)에 옮긴 후 실온에서 1 시간 동안 5% blotting-grade blocker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 blocking하였다. 검출하고자 하는 단백질과 특이적으로 결합하는 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 반응시켰다. 1차 항체는 항 p53항체(Millipore), 항 caspase 9 항체(Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) 및 항 PARP 항체(Cell Signaling Technology)은 1:1000, 항 Bax 항체(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)는 1:2000, 항 β-actin 항체(Sigma-Aldrich)는 1:5000으로 희석하여 사용하였다. 다음 날, 실온에서 3 시간 동안 2차 항체와 함께 배양하였다. 2차 항체는 Anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate와 Anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad)을 각각 1:3000으로 희석하여 사용하였다. 이후, chemiluminescent 용액으로 반응시켜 FluorChem E (Proteinsimple, San Jose, CA, USA)으로 확인하였다.

통계분석

실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내고, 통계적 유의성은 GraphPad Prism v7.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) 프로그램을 활용하여 일원분산분석(one-way ANOVA 및 Tukey's post host test) 및 Student *t*-test를 수행하여 검증하였다. *P* 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Results and Discussion

TCA에 의한 위암 세포의 생존 억제

AGS 세포주는 위암 중 가장 많은 비율을 차지하는 위선암(gastric adenocarcinoma) 세포주이며, 항암치료를 받은 적이 없는 환자로부터 분리된 세포주이다[13]. 따라서, 항암효능 평가에 대표적으로 쓰이는 세포주이다. 본 연구에서는 AGS세포주에서 MTT assay를 통해 TCA의 항암효과를 평가하였다. TCA를 AGS세포주에 24 시간 및 48 시간 동안 처리한 후, 세포의 생존율을 비교분석한 결과, 농도의존적으로 세포의 생존율이 감소하였다(Fig. 2). TCA 처리 48시간에서 IC50은 92.69 μM이었다. 또한, 25 μM TCA부터 유의적인 차이가 나타났으며, 고농도로 갈수록 시간에 따라 세포 생존 억제능의 차이가 커졌다. 이와 같은 암세포의 증식 억제 효과는 유방암 세포주, 간암 세포

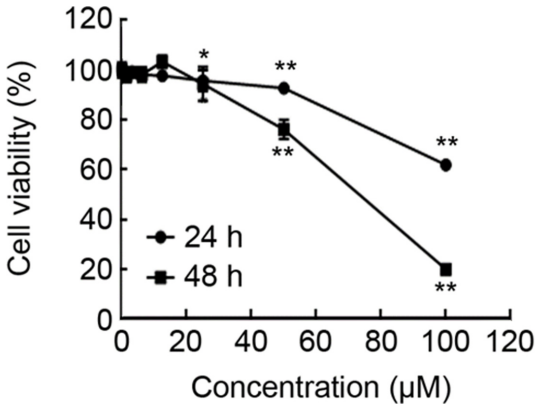

Fig. 2. TCA inhibits cell viability in AGS cells.
TCA was treated in AGS cells for 24 h or 48 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data showed as the mean ± SD (n=8). *P < 0.05; **P < 0.001 (one-way ANOVA).

주, 비소세포폐암 세포주, 대장암 세포주에서 보고된 바와 같은 양상을 나타냈다[5,8-10]. 아직까지 TCA가 위암세포주의 증식을 억제하는 작용기전에 대해서는 알려진 바가 없으므로, 이에 대하여 조사하였다.

AGS 세포에서 TCA처리에 의한 세포사멸 유도

TCA에 의해 세포 생존율 감소가 세포사멸에 의한 것인지를 확인하기 위하여 100 μM의 TCA를 24 시간 처리한 조건에서 이후 실험을 진행하였다. 먼저, TCA에 의한 AGS 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. TCA를 처리한 세포에서는 대조군 세포에 비하여 수적으로 감소되었을 뿐 아니라 정상세포의 모습과는 다르게 수축되어 있으며 수포처럼 보이는 세포들이 관찰되었다(Fig. 3A). 이는 전형적인 세포사멸의 형태학적 모습으로 알려져 있다[14,15].

이에 대한 분자학적인 기전을 확인하기 위하여, 세포사멸과 관련된 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 내재적 세포사멸 경로에서 작용하는 단백질인 p53, Bax, caspase 9 및 PARP의 발현 변화를 조사한 결과(Fig. 3B), TCA에 의하여 p53의 발현양이 유의적으로 증가되었다. 단백질 p53은 종양 억제 유전자로 세포주기, DNA 복구, 복제 노화 및 세포사멸에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며[16,17], 세포사멸 과정에 있어서 Bax를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[16,18]. 본 연구 결과에서도 p53과 마찬가지로 Bax의 발현이 TCA에 의해 증가됨을 확인할 수 있었다. 활성화된 Bax는 미토콘드리아에서 분비된 cytochrome c에 의하여 caspase 9을 활성화시키고, PARP도 활성화시킴으로써[19], 활성화된 이들 분자가 세포사멸을 초래한다고 알려져 있다[20]. TCA를 처리한 세포에서도 caspase 9과 PARP의 활성형인 cleaved caspase 9및 cleaved PARP의 밴드가 확인되었으며 이는 세포사멸이 유도되었음을 보여준다.

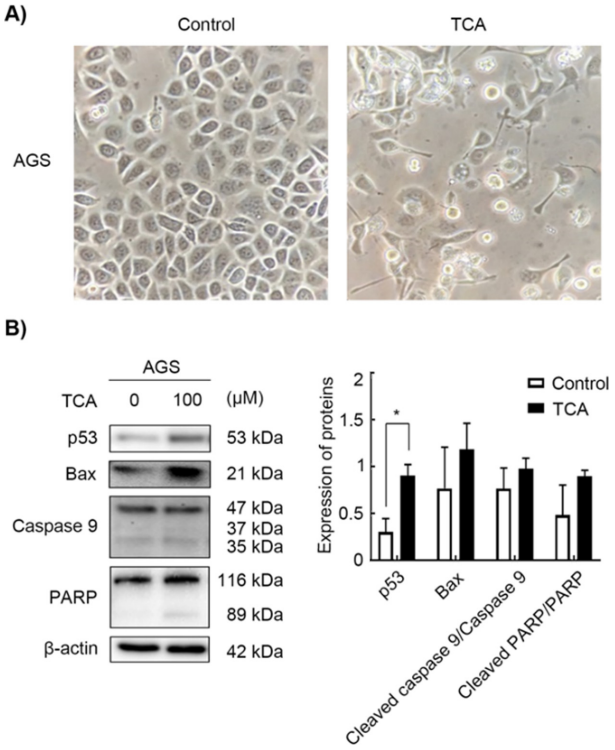

Fig. 3. TCA induced apoptosis via p53 pathway.
TCA (100 μM) was treated in AGS cells for 24 h. (A) Morphology of AGS cells treated by TCA. The cells were observed using microscopy (× 40). (B) Induction of apoptosis-related protein expression by TCA. Protein expression levels were detected using western blot analysis. Protein expression levels (Expression of proteins, x axes) were calculated to the ratio of target protein to β-actin using ImageJ software (three repeats). Data presented as the mean ± SD. *P < 0.01 (Student t-test).

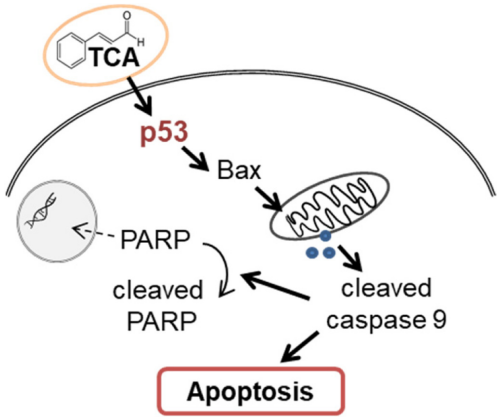

Fig. 4. Schematic representation of apoptosis by TCA in AGS cells.

AGS 세포주에서 신남알데히드(cinnamaldehyde)가 NF-κB활성 억제를 통해 *H.pylori*에 의한 염증을 저해한다[21]는 보고가 있었는데, 본 연구 결과로부터 AGS 세포주에서 TCA의 항암작용이 있음을 새로이 확인하였다. 또한, TCA

의 항암작용은 p53 경로를 통한 세포사멸을 유도함으로써 나타난다는 것을 밝혔다(Fig. 4). 기존에 보고된 타 암종뿐 만 아니라 위암세포에서도 TCA가 항암효과를 보였기에, 천연 유래 항암물질로서 개발 가능성을 시사하고 있다. 이를 위하여, AGS 세포주 이외의 위암세포주에서의 실험 및 in vivo 시험을 포함한 추가적인 연구가 요구된다.

Acknowledgement

이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임(과제번호 2016R1A6A1A03007648).

국문요약

트랜스 신남알데하이드(TCA)는 계피의 활성성분 중 하나로 알려져 있으며, 항바이러스, 항균, 항진균 뿐 아니라 일부 암세포주에서 항암 작용이 있다고 보고된 바 있다. 하지만, 위암세포주에서의 보고는 미비하며 그 작용기전에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 위암 AGS 세포주에 대한 증식 억제작용 및 그 기전을 살펴보았다. TCA는 농도의존적으로 AGS 세포의 생존율을 억제하였다. AGS 세포 형태로 보아 TCA에 의한 세포사멸을 확인할 수 있었다. 그 기전을 확인하기 위하여, 세포사멸 관련 단백질의 발현양을 조사한 결과, TCA는 p53과 Bax의 단백질 발현을 증가시켰다. 또한, 분절된 caspase 9 및 PARP의 발현이 증가되는 것으로부터 TCA가 AGS 세포주의 세포사멸을 유도하였음을 알 수 있었다. 본 연구결과로부터 TCA가 위암에 대한 항암 활성이 있음을 확인하였으며, 추후 지속적인 연구를 통해 항암제 후보물질로 기대된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Sunyi Lee https://orcid.org/0000-0003-0783-0480
Joohee Jung https://orcid.org/0000-0001-9124-9052

Reference

1. Bertuccio, P., Chatenoud, L., Levi, F., Praud, D., Ferlay, J., Negri, E., Malvezzi, M., La Vecchia, C., Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int. J. Cancer*, **125**, 666-673 (2009).
2. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA-Cancer J. Clin*., **68**, 394-424 (2018).
3. Orditura, M., Galizia, G., Sforza, V., Gambardella, V., Fabozzi, A., Laterza, M.M., Andreozzi, F., Ventriglia, J., Savastano, B., Mabilia, A., Lieto, E., Ciardiello, F., De Vita, F., Treatment of gastric cancer. *World J. Gastroenterol*., **20**, 1635-1649 (2014).
4. Salehifar, E., Avan, R., Janbabaei, G., Mousavi, S.K., Faramarzi, F., Comparison the incidence and severity of side effects profile of FOLFOX and DCF regimens in gastric cancer patients. *Iran. J. Pharm. Res*., **18**, 1032-1039 (2019).
5. Chiang, Y.F., Chen, H.Y., Huang, K.C., Lin, P.H., Hsia, S.M., Dietary antioxidant trans-cinnamaldehyde reduced visfatin-induced breast cancer progression: in vivo and in vitro study. *Antioxidants (Basel)*, **8**, 625 (2019).
6. Rao, P.V., Gan, S.H., Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evid.-based Complement. Alternat. Med.*, **2014**, 642942 (2014).
7. Ali, S.M., Khan, A.A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K.S., Polasa, H., Rao, L.V., Habibullah, C.M., Sechi, L.A., Ahmed, N., Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*., **4**, 20 (2005).
8. Chuang, L.Y., Guh, J.Y., Chao, L.K., Lu, Y.C., Hwang, J.Y., Yang, Y.L., Cheng, T.H., Yang, W.Y., Chien, Y.J., Huang, J.S., Anti-proliferative effects of cinnamaldehyde on human hepatoma cell lines. *Food Chem*., **133**, 1603-1610 (2012).
9. Wu, C., Zhuang, Y., Jiang, S., Tian, F., Teng, Y., Chen, X., Zheng, P., Liu, S., Zhou, J., Wu, J., Wang, R., Zou, X., Cinnamaldehyde induces apoptosis and reverses epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/β-catenin pathway in non-small cell lung cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol*., **84**, 58-74 (2017).
10. Li, J., Teng, Y., Liu, S., Wang, Z., Chen, Y., Zhang, Y., Xi, S., Xu, S., Wang, R., Zou, X., Cinnamaldehyde affects the biological behavior of human colorectal cancer cells and induces apoptosis via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol. Rep*., **35**, 1501-1510 (2016).
11. Milani, A., Rashidi, S., Mahmoudi, R., Douna, B., Cytotoxic activity of epigallocatechin and trans-cinnamaldehyde in gastric cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Biol*., **4**, 71-74 (2019).
12. Lee, S., Lee, S.K., Jung, J., Potentiating activities of chrysin in the therapeutic efficacy of 5-fluorouracil in gastric cancer cells, *Oncol. Lett.,* **21**, 24 (2021).
13. Barranco, S.C., Townsend Jr, C.M., Quraishi, M.A., Burger, N.L., Nevill, H.C., Howell, K.H., Boerwinkle, W.R., Heterogeneous responses of an in vitro model of human stomach cancer to anticancer drugs. *Invest. New Drugs*, **1**, 117-127 (1983).
14. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516 (2007).
15. Lu, C.C., Chiang, J.H., Tsai, F.J., Hsu, Y.M., Juan, Y.N.,

Yang, J.S., Chiu, H.Y., Metformin triggers the intrinsic apoptotic response in human AGS gastric adenocarcinoma cells by activating AMPK and suppressing mTOR/AKT signaling. *Int. J. Oncol*., **54**, 1271-1281 (2019).
16. Burns, T.F., El-Deiry, W.S., The p53 pathway and apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, **181**, 231-239 (1999).
17. Bae, W., Lim, H.K., Kim, K.M., Cho, H., Lee S.Y., Jeong C.S., Lee H.S., Jung, J., Apoptosis-inducing activity of marine sponge *Haliclona* sp. extracts collected from Kosrae in nonsmall cell lung cancer A549 cells. *Evid.-based Complement. Alternat. Med.,* **2015**, 717959 (2015).
18. Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R., Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, **303**, 1010-1014 (2004).
19. Yan, Z., Xu, T., An, Z., Hu, Y., Chen, W., Ma, J., Shao, C., Zhu, F., Costunolide induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma BGC-823. *BMC Complement. Altern. Med*., **19**, 151 (2019).
20. Deng, Y., Li, X., Li, X., Zheng, Z., Huang, W., Chen, L., Tong, Q., Ming, Y., Corilagin induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the mitochondrial apoptotic and death receptor pathways. *Oncol. Rep*., **39**, 2545-2552 (2018).
21. Muhammad, J.S., Zaidi, S.F., Shaharyar, S., Refaat, A., Usmanghani, K., Saiki, I., Sugiyama, T., Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde in *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 109-115 (2015).