

오미자 추출물의 대장암 세포(HT-29) 증식 억제 효과(II)

덕성여자대학교 : 류민주, 정하숙*

Antiproliferative activity of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) extracts
on colon cancer cell line(HT-29)

College of Natural Sciences, Duksung Women's University

Min Ju Ryu, Ha Sook Chung*

실험목적

이 연구의 목적은 오미자가 인체 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 암세포 성장 억제 및 억제기전에 미치는 영향을 살펴보고자 실험하였다.

재료 및 방법

○ 실험재료

연구에 사용한 오미자는 2010년 명진농장(소재지: 강원도 인제)에서 재배된 것을 사용하였고, human colon epithelial cell(HT-29)은 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

○ 실험방법

오미자 열수 추출물이 HT-29 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였고, 시료농도별 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 Hoechst 33342 용액으로 염색한 후 형광현미경에서 관찰하였다. 이 실험을 기본으로 시료 처리에 의한 대장암세포 증식 억제가 apoptosis, 또는 necrosis에 기인하는 것인지 확인하기 위해 세포내부에 존재하던 phosphatidyl serine와 affinity를 갖는 Annexin V의 성질을 이용하여 PI와 double staining을 실시하여 flow cytometry로 apoptosis 유발정도를 정량적으로 측정하였다. 앞선 결과들에서, HT-29 대장암 세포에 시료 처리 시 세포 사멸이 유도되었으므로 세포사멸과 관련된 단백질 caspase를 western blot analysis를 통해 단백질 발현을 관찰하였다.

실험결과

오미자 열수 추출물을 0, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL의 농도로 처리 시 HT-29 세포 사멸농도가 각각 0, 10, 70, 88%로, 농도가 증가할수록 HT-29 세포가 일정하게 사멸하는 것으로 확인되었다. 세포의 핵 염색 실험에서도 시료를 처리하지 않은 경우 culture plate에 안정적으로 부착되어 핵의 손상이 없이 전형적인 둥근 핵으로 일정한 반면, 시료를 처리한 경우, 농도가 높아질수록 세포 증식이 감소하였고, 핵이 손상되어 절편되고, cell shrinking, chromatin condensation 및 많은 apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화들이 뚜렷하게 관찰되었다.

* 주저자: E-mail: hasook@duksung.ac.kr, Tel : 02-901-8593

이 실험결과를 기본으로 HT-29 증식 억제제가 apoptosis인지 necrosis에 기인하는지 확인하기 위해 flow cytometry 분석 결과 세포 사멸은 0.15, 38.51, 53.26, 69.25%로 시료의 농도가 증가할수록 HT-29 세포의 사멸이 증가하는 것으로 나타났다.

특히 처리된 시료의 농도가 2.0 mg/mL까지는 early apoptosis가 더 많이 진행되었고, 4.0 mg/mL 농도에서는 late apoptosis가 더욱 크게 증가되었음을 확인하였다. Early apoptosis의 세포사멸이 진행 중인 세포는 annexin V-FITC에만 염색되고 propidium iodide로는 염색되지 않는 반면, late apoptosis의 세포사멸이 진행 중인 세포 또는 괴사(necrosis)가 진행 중인 세포들은 annexin V-FITC와 propidium iodide가 동시에 염색되며, 살아 있는 세포는 어느 것에도 염색되지 않는 양상을 나타낸다. 이는 세포가 생존하지 못하는 기전을 확인하기 위해서 세포사멸 여부를 확인한 것으로, 시료 농도가 증가할수록 annexin V-FITC 형광을 띤 세포가 시간에 따라서 점차 증가되는 사실을 통해 오미자 추출물이 대장암 세포의 자연사를 유발함을 확인하였다. Western blot에 의한 세포사멸과 관련된 단백질 실험에서는 pro-caspase-3과 pro-caspase-8이 모두 시료 농도에 대해 의존적으로 HT-29 세포사멸이 이루어지는 것을 확인하였다.

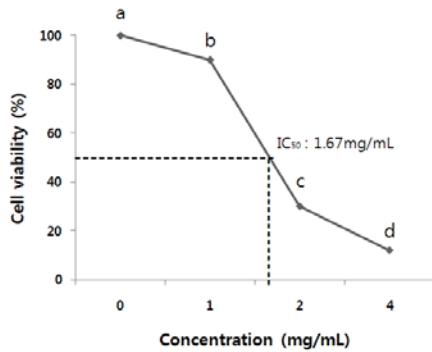


Fig. 1. Effect of *Schizandra chinensis* Baillon on HT-29 cells viability by MTT assay.

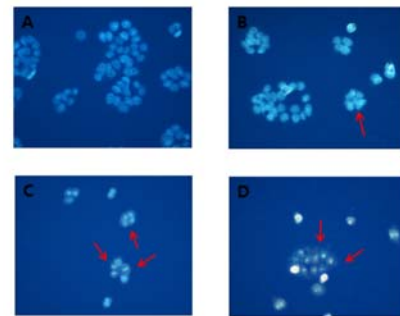


Fig. 2. Photomicrographs of nuclear morphological changes on HT-29 cells treated with *Schizandra chinensis* Baillon.

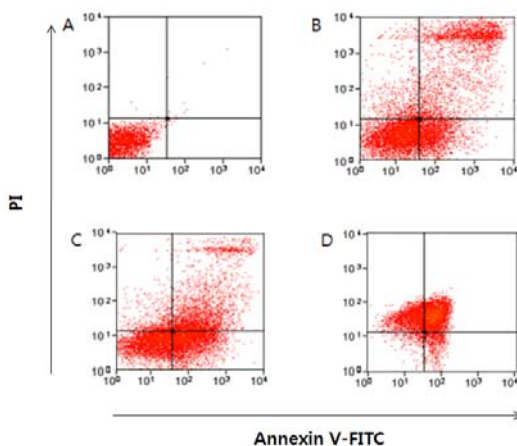


Fig. 3. Flow cytometry analysis by treatment *Schizandra chinensis* Baillon on HT-29 cells.

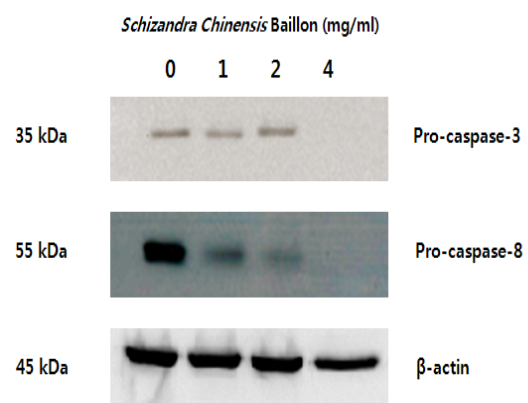


Fig. 4. Dose-dependent effect of *Schizandra chinensis* Baillon on the protein expression levels of pro-caspase-3 and caspase-8 on HT-29 cells.