

투스 에탄올 추출물에 의한 HT29 결장암 세포의 ROS 의존적 세포사멸 유도

Induction of ROS-dependent apoptosis by ethanol extract of *Hizikia fusiforme* in HT29 colon carcinoma cells

홍수현*, 최영현*

Su Hyun Hong and Yung Hyun Choi*

교수, 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 부산광역시 부산진구 양정로 52-57, 47227, 대한민국

Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan 47227, Korea

(Received 21 Nov 2022, Revised 5 Dec 2022, Accepted 14 Dec 2022)

Abstract *Hizikia fusiforme*, a type of brown algae, is widely used in Asian cuisine. It has been reported to have various pharmacological effects. In this study, the effects of the ethanol extract from *H. fusiforme* (EAHF) on the proliferation of human colon carcinoma cells were investigated. The effect on the survival of human hepatocarcinoma and colon carcinoma cells was examined, and results revealed that the anti-proliferative effects of EAHF were higher in colon carcinoma cells than in hepatocarcinoma cells. The inhibition of proliferation of HT29 colon carcinoma cells by EAHF treatment was closely related to the induction of apoptosis. EAHF treatment also increased caspase activity and poly(ADP-ribose) polymerase degradation, induced mitochondrial dysfunction, altered Bcl-2 family protein expression, and increased the rate of cytochrome c released from the mitochondria into the cytoplasm. Furthermore, the production of reactive oxygen species (ROS) was markedly stimulated by EAHF treatment, and when ROS production was blocked, EAHF-induced cytotoxicity was significantly attenuated. These results indicate that the anticancer activity of EAHF in HT29 colon carcinoma cells was induced by ROS-dependent mitochondrial impairment. While EAHF exhibited potent anticancer activity in colon carcinoma cells in this study, further studies on the active components of EAHF and their efficacy should be performed.

Keywords : *Hizikia fusiforme*, human colon cancer cells, apoptosis, ROS

서 론

해조류에는 다양한 천연 생리활성 화합물이 풍부하게 존재하여 오랫동안 식용 또는 약용으로 사용되어왔다. *Sagassaceae* 과에 속하는 툃(*Hizikia fusiforme*)

은 한국을 포함한 북서태평양에 서식하는 식용 갈조류의 일종이다[1]. 선행 연구들에 의하면 툃은 항산화, 항노화, 항염, 항암, 면역 조절, 골 기능 강화 및 항당뇨 활성과 같은 다양한 생리 활성을 가지고 있음이 알려져 있다[2-4]. 본 연구실에서도 그

* Corresponding authors

Phone: +82-51-890-3334 (SHH) Fax: +82-51-890-3333 (SHH)

E-mail: hongsh@deu.ac.kr (SHH)

Phone: +82-51-890-3319 (YHC) Fax: +82-51-890-3333 (YHC)

E-mail: choiyh@deu.ac.kr (YHC)

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

동안 톳 추출물의 미백, 항비만, 항염증, 항산화, 항콜레스테롤 등을 포함한 약리학적 효능에 관한 연구를 수행한 바 있으며, 백혈병 세포뿐만 아니라 다양한 고형암 세포에서의 항암 활성을 보고한 바 있다 [5-9].

항암 활성과 연관된 선행 연구에 의하면, 톳 추출물은 유방암세포의 증식을 억제하였으며, 이는 세포주기 진행에서 G1기 정지(G1 arrest)와 연관성이 있었다[10,11]. 또한, 인간 위암세포에서 세포사멸(apoptosis)을 유도하였고[12], 세포사멸 유도에서 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)에 대한 저항성을 극복할 수 있었다[13]. 특히 TRAIL 저항성 간암세포에서 톳 추출물은 TRAIL에 대한 감수성을 증대시켜, 항암제 내성 극복 가능성이 있음을 보고한 바 있다[14]. 아울러, 톳 추출물의 암세포 세포사멸 유도는 폐암, 전립선암, 흑색종 및 방광암세포 등에서도 보고된 바 있고[15-18], 이러한 항암 활성은 세포증식 관련 세포 내 신호 전달계의 활성 억제와 연관된 reactive oxygen species (ROS) 생성 의존적이었으며[16-18], 암세포의 침윤 또한 억제되었다[12,19]. 그럼에도 불구하고 톳 추출물이 결장암 세포의 증식에 미치는 영향은 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 톳 에탄올 추출물(ethanol extract of *H. fusiforme*, EAHF)이 인간 결장암 세포의 증식에 미치는 영향을 분석하였으며, 본 실험에 앞서 간암세포와 감수성을 비교하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에 사용된 인간 결장암(colon carcinoma, HCT116 및 HT29) 및 간세포 암종(hepatocellular carcinoma, Hep3B 및 HepG2) 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 모든 세포는 10% fetal bovine serum (WelGENE, Inc., Gyeongsan, Republic of Korea)과 1% penicillin-streptomycin (WelGENE, Inc.)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (WelGENE, Inc.)를 사용하여 5% CO₂ 및 37°C 조건에서 배양하였다.

EAHF의 준비 및 처리

본 연구에 사용된 톳은 울산시 정자동 해변에서

채취한 것으로서[5], EAHF의 제조를 위하여 건조된 톳을 과쇄한 후 4°C에서 10 ml/g의 비율로 80% 알코올에 침전시켰다[16]. 24시간 후, Whatman #2 필터를 통해 여과하고 동결건조시켜 건조된 잔류물(EAHF)을 얻은 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 100 mg/ml의 stock 용액으로 제조하여 -20°C에 보관하였다. EAHF를 세포에 처리하기 위하여 세포배양 배지에 적정 농도로 희석하여 처리하였다.

세포 생존율 측정

EAHF가 암세포의 생존에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 다양한 농도의 EAHF를 단독으로 48시간 동안 처리하거나, 10 mM의 N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 1시간 동안 처리한 후, 150 µg/ml의 EAHF를 48시간 동안 추가로 처리한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 최종 농도가 0.5 mg/ml가 되도록 첨가하였다. 3시간 반응 후, 형성된 formazan crystal을 DMSO에 용해시키고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 처리되지 않은 대조군 세포에서 형성된 formazan crystal의 광학 밀도는 100% 생존율을 나타내는 데 사용되었다.

세포사멸 유발 빈도의 정량적 측정

세포사멸 유도의 정량적 평가를 위하여 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 적정 농도의 EAHF를 48시간 동안 처리하거나, EAHF 처리 1시간 전에 10 mM의 NAC을 처리한 후 150 µg/ml의 EAHF를 48시간 동안 추가로 처리하였다. 처리가 끝난 세포를 수집하여 phosphate buffer saline (PBS)로 세척하고, 4°C에서 20분 동안 75% 에탄올에 고정시켰다. 그 후, 실온에서 20분 동안 암 하에서 150 µl의 annexin V-FITC 및 propidium iodide (PI) 용액으로 염색하고, flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 annexin V-양성 세포 집단의 백분율을 세포사멸이 유도된 빈도로 정량화하였다.

단백질의 분리 및 immunoblotting

세포사멸 조절 단백질들의 발현에 미치는 EAHF의 영향을 조사하기 위하여 선행 방법에 준하여 총 단백질을 추출하였으며[17], 미토콘드리아 및 세포질 단백질은 mitochondrial fractionation kit (Active Motif, Inc., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. Sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 이용하여 각 처리군에서 추출된 동량의 단백질(30~50 µg)을 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane (Bedford, MA, USA)으로 전이시켰다. 단백질들이 전이된 membrane을 Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA), Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입한 1차 항체(Table 1)로 반응시키고 적절한 horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA)와 추가 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence solution (R&D Systems Inc.)을 첨가하여 단백질의 발현 양상을 검출하였다.

Caspase 활성의 측정

Caspase의 활성 증가의 정량적 평가를 위하여 colorimetric assay kit (R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 EAHF가 처리된 세포를 kit에서 제공된 용해 완충액을 이용하여 용해시켰다. 이어서 상청액을 수집하고, 각 caspase의 기질(caspase-3, Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide (pNA); caspase-8, Ile-Glu-Thr-Asp-pNA; caspase-9, Glu-His-Asp-pNA)과 혼합 후 37°C에서 20분간 반응

한 상대치로 제시하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP, Δψm)의 측정

EAHF가 처리된 세포의 미토콘드리아 활성 평가를 위한 MMP의 값을 측정하기 위하여 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanane iodide (JC-1)를 사용하였다. 이를 위하여 처리가 끝난 세포를 PBS로 세척하고 10 µM의 JC-1 용액 (Sigma-Aldrich Chemical Co.)과 혼합하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 이후 세포를 다시 PBS로 세척하고 flow cytometer를 사용하여 JC-1 aggregate 및 monomer의 비율을 산출하였으며, monomer의 빈도를 MMP가 소실된 세포의 빈도로 제시하였다.

ROS 생성 측정

ROS의 생성이 EAHF 처리에 의한 세포사멸에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색을 실시하였다. 이를 위하여 제시된 시간 동안 EAHF가 처리된 세포를 대상으로 10 µM의 DCF-DA (Eugene, OR, USA)로 염색한 후 flow cytometer를 사용하여 ROS 생성의 정도를 평가하였다. 아울러 EAHF 처리에 의한 ROS의 생성에 미치는 NAC의 영향을 조사하기 위하여 10 mM의 NAC을 1시간 동안 처리한 후, 150 µg/ml의 EAHF를 1시간 동안 추가로 처리하였다. 처리가 끝난 세포를 flow cytometer로 분석하거나 형광현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 ROS 생성 정도를 시각화하였다.

Table 1. List of antibodies used in this study

Antibody	Species	Dilution	Catalog No.	Vendor
caspase-9	Rabbit polyclonal	1:1000	PA5-105271	Thermo Fisher Scientific, Inc.
caspase-8	Mouse monoclonal	1:1000	MA1-41280	Thermo Fisher Scientific, Inc.
caspase-3	Mouse monoclonal	1:1000	sc-56052	Santa Cruz Biotechnology Inc.
PARP	Mouse monoclonal	1:1000	sc-8007	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Bcl-2	Mouse monoclonal	1:1000	sc-509	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Bax	Mouse monoclonal	1:1000	sc-7480	Santa Cruz Biotechnology Inc.
cytochrome c	Mouse monoclonal	1:500	sc-13560	Santa Cruz Biotechnology Inc.
COV IV	Rabbit polyclonal	1:500	4844	Cell Signaling Technology Inc.
actin	Mouse monoclonal	1:1000	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology Inc.

시켰다. 각 caspase 활성은 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대

통계 분석

실험 결과의 통계적 분석을 위하여 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) 를 이용하였으며, 결과는 최소 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 평균 값(\pm standard deviation, SD)으로 제시하였다. One-way analysis of variance (ANOVA) 를 실시하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 처리 그룹(n=3) 간의 유의성을 검증하였다. $p < 0.05$ 이하일 때 유의성이 있다고 간주하였다.

결과 및 고찰

EAHF 처리에 의한 HT29 결장암 세포의 세포사멸 유도

EAHF가 인간 결장암세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 정상세포에서는 세포독성이 관찰되지 않았던 범위[5]에서의 EAHF가 처리된 조건에서 48시간 배양된 결장암세포를 대상으로 MTT 분석을 수행하였다. Figure 1에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, EAHF가 처리된 HCT116 및 HT29 결장암 세포의 세포 생존율은 처리 농도 의존적으로 감소하였으며, 두 암세포에서 IC50 value는 약 200 $\mu\text{g/ml}$ 정도로 나타났다. 아울러 동일 조건에서 조사된 Hep3B 세포에서 IC50 value는 약 400 $\mu\text{g/ml}$ 정도를 추정되며, HepG2 세포에서는 본 연구에서 사용된 농도보다 높은 것으로 나타났다. 따라서 EAHF에 대한 항암 활성은 간암세포와 비교하여 결장암세포에서 높음을 알 수 있었다. 또한, 동일 조건에서 수행된 B16F10 마우스 흑색종 세포와 비교하였을 경우에도 EAHF는 결장암세포에서 세포 독성에 대한 감수성이 상대적으로 높았다[16].

이러한 EAHF에 의한 결장암세포에서의 세포증식 억제 효능이 세포사멸 유도와 연관이 있는지를 조사하기 위하여 HT29 세포를 선정하였으며, EAHF 처리는 약 50% 정도의 세포 생존율을 보인 150 $\mu\text{g/ml}$ 을 최고 농도로 설정하여 48시간 동안 처리하였다. 이어서 처리가 끝난 HT29 세포를 수거하여 annexin V-FITC/PI 용액으로 염색한 후 flow cytometer를 이용하여 annexin V-양성 세포를 세포사멸이 유도된 빈도로 산출하였다. Figure 2의 결과에서 알 수 있듯이, EAHF가 처리된 HT29 세포는 EAHF 처리 농도 의존적으로 세포사멸 유도가 증가되었다. 따라서 EAHF 처리에 의한 결장암세포의 세포 생존율 억제

는 세포사멸 유도에 따른 현상임을 알 수 있었고, 이는 B16F10 마우스 흑색종 세포를 포함하여 전립선암세포 및 백혈병 세포 등에서 관찰된 결과와 유사하였다[16,17,20]. 따라서 본 결과는 결장암세포를 포함한 다양한 암종에서 EAHF의 항암 활성은 세포사멸 유도와 밀접한 연관성이 있음을 의미한다.

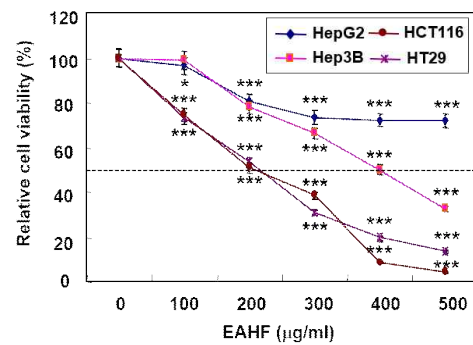


Figure 1. Inhibition of cell viability by EAHF treatment in various human cancer cell lines. Human hepatocellular carcinoma (Hep3B and HepG2) and colon carcinoma (HCT116 and HT29) cells were treated with the indicated concentrations of EAHF for 48 h. Cell viability of EAHF-treated cells was measured by the MTT assay. Data were presented as mean \pm SD of three independent experiments ($*p < 0.05$ and $***p < 0.001$ vs untreated cells).

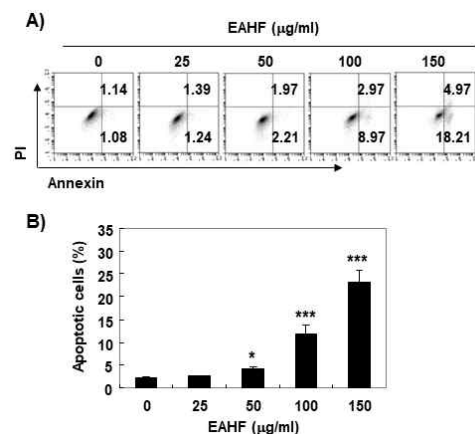


Figure 2. Induction of apoptosis by EAHF treatment in HT29 cells. HT29 cells were treated with the indicated concentrations of EAHF for 48 h. For quantitative analysis of apoptosis-induced cells, annexin V and PI double staining was performed. (A) Representative profiles of flow cytometry results obtained after annexin V/PI staining were presented. (B) The frequencies of apoptosis-induced cells were expressed as percentages of the numbers of annexin V-positive cells. Data were presented as mean \pm SD of three independent

experiments (**p* < 0.05 and ****p* < 0.001 vs untreated cells).

mean ± SD of three independent experiments (**p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 vs untreated cells).

HT29 결장암 세포에서 caspase의 활성화 미치는 EAHF의 영향

세포사멸 유도는 암세포의 증식을 억제하는 중요한 항암 경로이며, 세포사멸을 회피하는 능력은 암세포의 전형적인 특징 중 하나이다. 세포사멸의 유도는 개시 신호에 따라 크게 외재적 및 내재적 경로로 구분되면, caspase는 세포사멸 신호전달 경로의 실행자 역할을 한다[21,22]. 그중, death receptor (DR) 매개 외인성 경로는 death ligand가 세포 표면의 DR에 결합에 따른 caspase-8의 활성화 증가에 의해 시작되는 반면, 미토콘드리아 매개 내인성 경로는 caspase-9의 활성화에 의해 개시된다. Caspase-8 및 -9의 활성화는 caspase-3 및 -7과 같은 효과기 caspase를 활성화시켜 세포사멸을 완료하기 때문에, caspase-8 및 -9는 각각 두 경로에서 개시자 caspase로 분류된다[23,24]. 따라서 EAHF 처리에 의한 HT29 결장암 세포의 세포사멸 유도에 이러한 caspase cascade가 관여하는지를 조사하기 위하여, EAHF가 처리된 HT29 세포를 대상으로 caspase-8, -9 및 -3의 발현과 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

Figure 3A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, EAHF의 처리 농도가 증가할수록 비활성 caspase-3의 발현은 감소된 반면, 활성화형 caspase-3의 발현은 증가하였다. 비록 caspase-8 및 -9의 활성화형 발현의 증가는 관찰할 수 없었지만, 그들의 비활성형은 EAHF 농도 증가에 따라 점차적으로 감소되어 활성화형으로 전환되었음을 알 수 있었다. 따라서 그들의 활성을 정량적으로 평가하기 위하여 각 caspase의 기질을 이용한 그들의 활성 정도를 평가한 결과, EAHF의 처리 농도 의존적으로 3가지 caspase의 활성이 유의적으로 증가하였다(Figure 3B). 아울러 caspase-3과 같은 효과기 caspase의 대표적인 기질 단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 단편화[22,23] 또한 증가되었다(Figure 3A). 따라서 EAHF에 의한 HT29 세포의 세포사멸 유도는 외재적 및 내재적 경로의 활성화가 동시에 관여하는 caspase 의존적 현상임을 암시하며, 이는 일부 이전 연구의 결과와 잘 일치된다[16,17,20].

HT29 결장암 세포에서 Bcl-2 family의 발현 및 미토콘드리아의 기능에 미치는 EAHF의 영향

HT29 세포에서 EAHF에 의해 유도되는 세포사멸 경로를 추가적으로 규명하기 위해 Bcl-2 family에 속하는 인자들의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Bcl-2 family는 미토콘드리아 매개 세포사멸 유도에 핵심적인 역할을 세포사멸 촉진(pro-apoptotic) 및 억제(anti-apoptotic) 단백질로 구성되어 있다[23,24]. 그중, 세포사멸 촉진에 관여하는 Bax와 같은 단백질의 상향 조절과 함께 세포사멸 억제에 관여하는 Bcl-2와 같은 단백질의 하향 조절은 미토콘드리아 투과성을 증가시킬 수 있다. 이에 따라 cytochrome *c*를 포함한 apoptogenic factor가 미토콘드리아에서 세포질로의 방출이 촉진되어 세포사멸을 완결시킨다[21,25]. 본 연구의 결과에 의하면, EAHF가 처리된 HT29 세포에서 Bcl-2의 발현은 EAHF 처리 농도 증가에 따라 감소된 반면, Bax의 발현은 증가되었다(Figure 4A). 다음은 이러한 Bcl-2 family 단백질들의 발현 변화가 미토콘드리아의 기능 손상과 연관성이 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 MMP의 변화를 조사하였

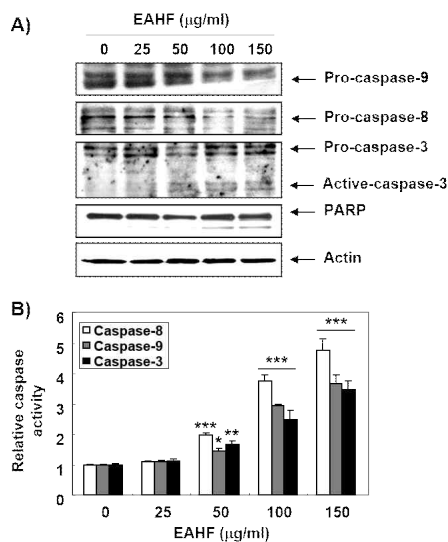


Figure 3. Activation of caspases by EAHF treatment in HT29 cells. HT29 cells were treated with the indicated concentrations of EAHF for 48 h. (A) The results of immunoblotting for the indicated proteins were presented, and actin was used as a loading control. (B) To measure the activity of caspases, colorimetric ELISA assay kits were used. Data were presented as

으며, EAHF 처리 농도의 증가에 따라 MMP의 소실을 의미하는 JC-1 monomer의 비율이 증가하여 미토콘드리아의 기능 손상이 동반되었음을 알 수 있었다 (Figure 4B). 이와 동시에 EAHF가 처리된 세포의 세포질에서 cytochrome *c*의 발현이 증가되어, cytochrome *c*가 미토콘드리아에서 세포질로 유리되었음을 확인하였다(Figure 4C 및 4D). 즉 EAHF가 처리된 HT29 세포에서 Bax/Bcl-2 비율의 증가에 따라 미토콘드리아 막 투과성이 증대되어 cytochrome *c*가 세포질로 유출되었으며, 이는 caspase-9 활성화에 따른 caspase-3의 활성을 증가시켰음을 의미한다. 이러한 현상은 선행 연구에서와 부분적으로 공통되는 현상으로[16,17] EAHF에 의한 암세포의 세포사멸 유도에는 외재적 경로뿐만 아니라 내재적 경로의 활성화 증가가 핵심적임 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

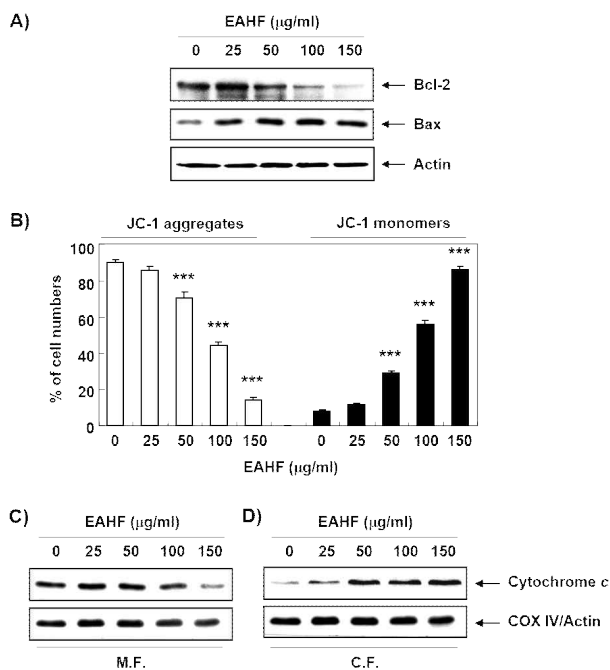


Figure 4. Effects of EAHF treatment on the expression of Bcl-2 family proteins and cytochrome *c*, and MMP in HT29 cells. HT29 cells were treated with the indicated concentrations of EAHF for 48 h. (A) Total proteins were isolated and immunoblotting was performed. Actin was used as a loading control. (B) To determine the extent of MMP loss, cells were stained with JC-1 dye and then flow cytometry was performed. Data were presented as mean ± SD of three independent experiments (***p* < 0.001 vs untreated cells). (C and D) In a parallel experiment, cytochrome *c* expression was analyzed from isolated mitochondrial and cytoplasmic proteins. Cytochrome oxidase su

bunit VI (COX VI) and actin were included as loading controls, respectively (MF, mitochondrial fraction; CF, cytosolic fraction).

HT29 결장암 세포에서 ROS의 생성에 미치는 EAHF의 영향

한편, 산화적 스트레스는 세포 기능과 증식을 조절하는 핵심 요소이다. 정상적인 생리적 조건에서 일정 수준의 ROS는 세포 기능의 유지에 요구되지만, 과도한 ROS 축적은 세포 손상을 유발할 수 있다 [26,27]. 많은 선행 연구들에서 ROS 생성의 조절이 세포사멸의 중요한 요인 중 하나이며, 세포 내 산화/환원 불균형으로 인한 산화적 스트레스가 세포사멸을 촉진하는 ROS의 과도한 생성을 유발할 수 있음을 제시하였다[27,28]. 특히 EAHF는 정상 세포에서는 항산화 활성화에 의해 ROS의 생성을 억제하는 것으로 보고된 바 있다[29,30]. 따라서 HT29 세포에서 ROS의 생성에 미치는 EAHF의 영향을 조사하였으며, 이를 위하여 EAHF가 처리된 세포를 DCF-DA로 염색한 후, ROS의 생성 여부를 정량적으로 평가하였다. 그 결과, ROS의 생성은 EAHF 처리 30분 이내에 가장 높게 나타났으며, 이후 처리 시간의 증가에 따라 서서히 감소되었다(Figure 5A-C). 그러나 ROS 소거제인 NAC이 전처리된 세포에서는 EAHF가 처리된 세포에 비해 ROS 수준이 현저히 감소되었다.

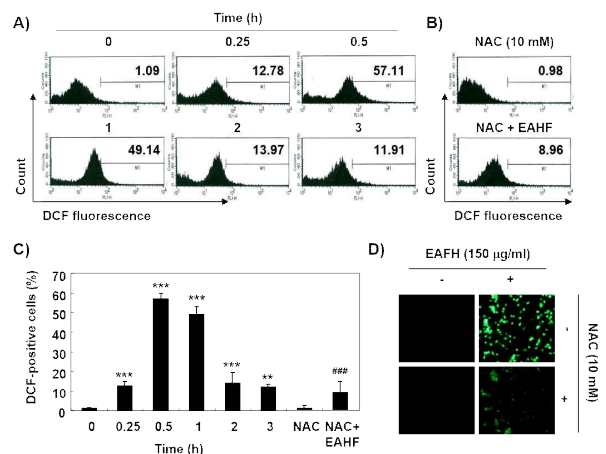


Figure 5. Increased ROS production by EAHF treatment in HT29 cells. HT29 cells were cultured in media containing 150 μg/ml EAHF for the indicated times, or pre-treated with 10 mM NAC for 1 h (A), followed by exposure to 150 μg/ml EAHF for an additional 1 h (B and D). (A-C) After staining with DCF-DA, ROS generation in each experimental group was measured by flow cytometry. (A and B) Representative

profiles for ROS generation were presented. (C) Each data was presented as the mean \pm SD ($***p < 0.001$ vs untreated cells, $###p < 0.001$ vs 150 $\mu\text{g/ml}$ EAHF-treated cells). (D) ROS accumulation was detected by a fluorescence microscope and representative fluorescence micrographs depicting ROS generation are presented.

다음은 EAHF에 의하여 증가된 ROS가 EAHF로 유도된 세포사멸 및 생존율 억제에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 이를 위하여 NAC을 전처리하여 인위적으로 ROS의 생성이 차단된 조건에서 EAHF가 처리된 HT29 세포에서 세포사멸이 억제되었는지를 조사한 결과, 세포사멸 유도의 억제와 함께 생존력 감소가 유의하게 차단되었다(Figure 6). 이러한 결과는 ROS 생성이 적어도 EAHF의 항암 활성에서 상류 조절인자 역할을 한다는 선행 연구 결과를 잘 뒷받침하여 준다[16,17]. ROS의 주요 세포 내 공급원은 미토콘드리아이지만, ROS가 전자 전달 사슬에 관여하는 다양한 거대 분자에 대해 높은 반응성을 나타내기 때문에 ROS의 과도한 축적은 미토콘드리아 기능 장애의 매개체로 알려져 있다[27,31]. 그러나 ROS의 생성은 호기성 호흡과 관련된 미토콘드리아 손상 외에도 산화 환원 항상성 및 세포 신호의 다양한 경로와 관련되어 있기 때문에[28,31], ROS 생성의 기원에 대한 추가 조사가 요구된다.

$\mu\text{g/ml}$ EAHF for an additional 48 h. (A and B) For quantitative analysis of apoptosis-induced cells, annexin V and PI double staining was performed. (A) Representative profiles of flow cytometry results obtained after annexin V/PI staining were presented. (B) The frequencies of apoptosis-induced cells were expressed as percentages of the numbers of annexin V-positive cells. (C) Cell viability was measured by the MTT assay. (B and C) Each data was presented as the mean \pm SD ($***p < 0.001$ vs untreated cells, $###p < 0.001$ vs 150 $\mu\text{g/ml}$ EAHF-treated cells).

결론

본 연구에서는 톱 에탄올 추출물(EAHF)이 인체 결장암세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 인체 간암세포와 결장암세포의 증식에 미치는 EAHF의 영향을 먼저 조사하였으며, EAHF에 의한 증식억제 효과는 결장암세포에서 높게 관찰되었다. EAHF 처리에 의한 HT29 결장암세포의 증식억제는 세포사멸 유도와 밀접한 연관성이 있었고, EAHF 처리는 HT29 세포에서 caspase의 활성을 증가시켰으며, PARP의 분해를 동반하였다. 아울러 EAHF가 처리된 HT29 세포에서 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화에 따른 미토콘드리아 기능 손상이 유발되었으며, 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 유리를 증가시켰다. 또한, EAHF는 ROS의 생성을 촉진시켰으며, 인위적인 ROS의 생성 차단은 EAHF에 의한 세포독성을 약화시켰다. 따라서 EAHF에 의한 HT29 결장암세포에서의 항암 활성은 ROS 의존적 미토콘드리아 기능 손상에 의한 것임을 알 수 있었다.

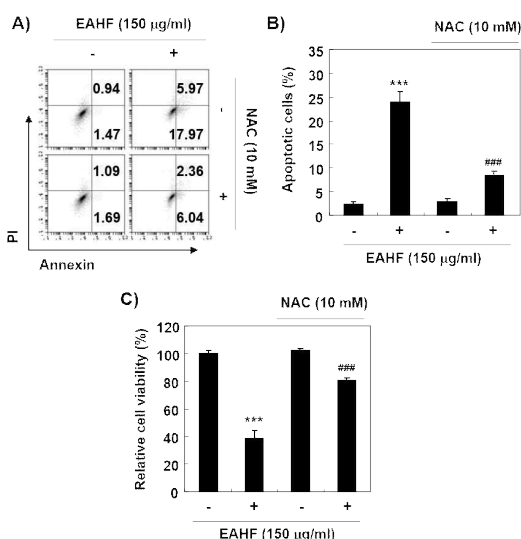


Figure 6. Induction of ROS-dependent apoptosis and growth inhibition by EAHF treatment in HT29 cells. HT29 cells were cultured in media containing the indicated concentrations of EAHF for 48 h, or pre-treated with 10 mM NAC for 1 h, followed by exposure to 150

References

- Meinita, M.D.N., Harwanto, D., Sohn, J. H., Kim, J. S., Choi, J. S. 2021. *Hizikia fusiformis*: Pharmacological and Nutritional Properties. *Foods* **10**, 1660.
- Nie, Y. Y., Zhou, L. J., Li, Y. M., Yang, W. C., Liu, Y. Y., Yang, Z. Y., Ma, X. X., Zhang, Y. P., Hong, P. Z., Zhang, Y. 2022. *Hizikia fusiforme* functional oil (HFFO) prevents neuroinflammation and memory deficits evoked by lipopolysaccharide/aluminum trichloride in zebrafish. *Front. Aging Neurosci.* **14**, 941994.
- Kim, M. E., Cho, J. H., Jung, I., Kim, H. K., Lee, J. S. 2020. *Hizikia fusiforme* extract enhances dendritic cell

- maturation *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1861-1869.
4. Jiang, X., Jin, W., Zhu, F. 2020. Dietary *Hizikia fusiforme* enhance survival of white spot syndrome virus infected crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.* **103**, 88-94.
 5. Park, C., Choi, Y. H. 2009. *Hizikia fusiforme* inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production by PMA through inactivation of NF- κ B. *J Life Sci.* **19**, 1396-1420.
 6. Kim, H. S., Choi, E. O., Park, C., Choi, Y. H., Hyun, S. K., Hwang, H. J. 2011. Effect of *Hizikia fusiforme* extracts on antioxidant enzyme activity and vitamin E concentration in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci Nutr.* **40**, 1556-1561.
 7. Kim, H. S., Choi, E. O., Park, C., Choi, Y. H., Chung, K. T., Hwang, H. J. 2012. Effect of *Hizikia fusiforme* extracts on serum lipid profile and anti-inflammatory effects of the rat. *Cancer Prev. Res.* **17**, 169-175.
 8. Choi, E. O., Kim, H. S., Han, M. H., Choi, Y. H., Kim, B. W., Hwang, H. J. 2012. Effects of *Hizikia fusiforme* extracts on adipocyte differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Life Sci.* **22**, 1399-1406.
 9. Choi, E. O., Kim, H. S., Han, M. H., Choi, Y. H., Park, C., Kim, B. W., Hwang, H. J. 2013. Effects of *Hizikia fusiforme* fractions on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. *J. Life Sci.* **23**, 1495-1500.
 10. Jung, S. H., Hwang, W. D., Nam, T. J., Choi, Y. H. 2009. Apoptosis induction of human breast carcinoma cells by ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme*. *J. Life Sci.* **19**, 1581-1590.
 11. Jung SH, Choi YH. 2009. Induction of G1 arrest of cell cycle by ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme* in human breast carcinoma cells, *Cancer Prev Res.* **14**, 153-160.
 12. Choi, Y. H. 2010. Inhibition of cell invasion by ethyl alcohol extracts of *Hizikia fusiforme* in AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J. Life Sci.* **20**, 1784-1791.
 13. Kim, T. Y., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Choi, I. W., Jeong, T. K., Nam, T. J., Kim, S. K., Choi, Y. H. 2008. Ethyl alcohol extracts of *Hizikia fusiforme* sensitize tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J. Med. Food* **12**, 782-787.
 14. Kang, C. H., Karunarathne, W. A. H. M., Molagoda, I. M. N., Choi, Y. H., Lee, S. H., Kim, G. Y. 2018. Ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme* synergistically enhances apoptosis in TRAIL-administrated Hep3B cells. *IOSR J. Pharm.* **8**, 58-65.
 15. Park, S. H., Shin, D. Y., Eom, H. S., Chi, G. Y., Choi, Y. H. 2010. Apoptosis induction of human lung cancer cells by methyl alcohol extracts of *Hizikia fusiforme*, *Cancer Prev. Res.* **15**, 164-171.
 16. Park, C., Lee, H., Hwang-Bo, H., Ji, S. Y., Kim, M. Y., Kim, S. Y., Hong, S. H., Kim, G. Y., Choi, Y. H. 2020. Ethanol extract of *Hizikia fusiforme* induces apoptosis in B16F10 mouse melanoma cells through ROS-dependent inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **21**, 1275-1282.
 17. Choi, E. O., Lee, H., Park, C., Kim, G. Y., Cha, H. J., Kim, S., Kim, H. S., Jeon, Y. J., Hwang, H. J., Choi, Y. H. 2020. Ethanol extracts of *Hizikia fusiforme* induce apoptosis in human prostate cancer PC3 cells via modulating a ROS-dependent pathway. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **10**, 78-89.
 18. Song, J. H., Won, S. Y., Hwang, B., Jung, S., Choi, C., Park, S. S., Choi, Y. H., Kim, W. J., Moon, S. K. 2020. *In vitro* and *in vivo* antitumor efficacy of *Hizikia fusiforme* against bladder cancer. *Nutrient.* **12**, 2159.
 19. Kim, S. O., Choi, Y. H. 2010. The ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme* inhibits matrix metalloproteinase activity and regulates tight junction related protein expression in Hep3B human hepatocarcinoma cells. *J. Med. Food* **13**, 31-38.
 20. Kang, C. H., Kang, S. H., Boo, S. H., Park, S. Y., Choi, Y. H., Moon, D. O., Kim, G. Y. 2011. Ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme* induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia U937 cells by generation of reactive oxygen species. *Trop. J. Pharm. Res.* **10**, 739-746.
 21. Rajabi, S., Maresca, M., Yumashev, A. V., Choopani, R., Hajimehdipoor, H. 2021. The most competent plant-derived natural products for targeting apoptosis in cancer therapy. *Biomolecules* **11**, 534.
 22. Croce, C. M., Reed, J. C. 2016. Finally, an apoptosis-targeting therapeutic for cancer. *Cancer Res.* **76**, 5914-5920.
 23. Dadsena, S., Zollo, C., García-Sáez, A. J. 2021. Mechanisms of mitochondrial cell death. *Biochemical Society Transactions* **49**, 663-674.
 24. Wen, X., Lin, Z. Q., Liu, B., Wei, Y. Q. 2012. Caspase-mediated programmed cell death pathways as

- potential therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. **45**, 217-224.
25. Kantari, C., Walczak, H.. 2011. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1813**, 558-563.
 26. Brillo, V., Chierigato, L., Leanza, L., Muccioli, S., Costa, R. 2021 Mitochondrial dynamics, ROS, and cell signaling: A blended overview. *Life (Basel)* **11**, 332.
 27. Helfinger, V., Schröder, K. 2018. Redox control in cancer development and progression. *Molecular Aspects of Medicine* **63**, 88-98.
 28. García-Sánchez, A., Miranda-Díaz, A. G., Cardona-Muñoz, E. G. 2020. The role of oxidative stress in physiopathology and pharmacological treatment with pro- and antioxidant properties in chronic diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**, 2082145.
 29. Wang, L., Oh, J. Y., Kim, H. S., Lee, W., Cui, Y., Lee, H. G., Kim, Y., Ko, J. Y., Jeon, Y. 2018. Protective effect of polysaccharides from celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress *in vitro* in Vero cells and *in vivo* in zebrafish. *Int. J. Biol, Macromol.* **112**, 483-489.
 30. Baek, J., Lim, S. 2017. Effect of *Hizikia fusiformis* extracts on reactive oxygen species mediated oxidative damage. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* **4**, 120-126.
 31. Larosa, V., Remacle, C. 2018. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience Reports* **38**, BSR20171492.