

In Vitro Evaluation of Anti-cancer Properties of Hongyong on SNU-80 Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Line

Gaeun Kim* and Eun-Jung Kim†,**

Department of Biomedical Laboratory Science, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Anaplastic thyroid cancer has the highest mortality rate of all thyroid cancers and shows low responsiveness to most treatments. Hongyong, a reddish-colored potato, is an excellent source of dietary polyphenol containing a large amount of anthocyanins, which has anti-cancer and anti-inflammatory effects. This study investigated the effects of Hongyong extract on apoptosis and invasiveness in SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells. The quantification of the total polyphenol content was done by spectrophotometric measurement. Cell growth was measured by using 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl) 2H tetrazolium, monosodium salt (MTS) assay. Cell cycle was analyzed through FACS analysis. Induction of apoptosis in cells was investigated by annexin V staining using flow cytometer and the expression of caspase-3 and Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) through western blot. mRNA expression and protein activation of matrix metalloproteinases (MMP)-2/-9 were examined by RT-PCR and zymography. As a result, the TPC of Hongyong was 292.43 ± 8.42 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g dry extract. Hongyong showed a dose-dependent cell growth inhibition, and the IC_{50} values was 1,000 $\mu\text{g/mL}$. sub-G1 phase was more than doubled compared to the control group, and S and G2/M phase arrest were also induced. Hongyong induced apoptosis by increasing FITC-Annexin V-positive cells and increased the activation of caspase-3 (cleaved caspase-3) and PARP (fragmented PARP). Hongyong significantly inhibited mRNA expression and protein activation of MMP-2/-9 in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-treated SNU-80 cells. Therefore, this study suggests the possibility of development of Hongyong extract as an anti-cancer agent.

Key Words: Anti-cancer properties, Apoptosis, Hongyong, SNU-80 anaplastic thyroid cancer cells

서 론

갑상선암은 가장 흔한 내분비계 악성 종양으로, 발병률은 전세계적으로 꾸준히 증가하고 있다. 국내 갑상선암의 발병률은 보건복지부 암등록통계에 따르면 2000년부터 급격히 증가해 오고 있으며, 최근에는 남녀 전체에서 가장 많이 발생한 암으로 보고되고 있다. 갑상선암은 분화 정도에 따라 고분화암, 역형성(미분화)암, 기타(저분화암,

전이암)로 분류되고 있다. 이들 중 역형성 갑상선암은 전체 갑상선 암의 2% 미만을 차지하는 드문 종양으로, 높은 악성도로 인해 평균 생존율은 진단 후 3~5개월이며, 1년 생존율은 20% 미만으로 낮은 생존율을 나타낸다 (Amaral et al., 2020; Smallridge and Copland, 2010).

역형성 갑상선암(Anaplastic thyroid cancer, ATC)의 발생 기전은 여전히 명확히 밝혀져 있지 않지만, 대부분은 기존의 분화 갑상선암에서 탈분화를 통해 발생한다고 알려져 있다(Paes and Ringel, 2008; Park, 2010; Volante et al., 2021).

Received: November 9, 2023 / Revised: December 5, 2023 / Accepted: December 5, 2023

* Undergraduate student, ** Professor.

† Corresponding author: Eun-Jung Kim. Department of Biomedical Laboratory Science, Sangji University, Wonju 26339, Korea.

Tel: +82-33-738-7683, Fax: +82-33-738-7683, e-mail: jung0724@sangji.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article 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.

또한 ATC는 빠른 성장과 강한 침윤 및 전이와 같은 능력을 갖고 있어 어떠한 치료법에도 뚜렷한 반응을 보이지 않으며, 대다수의 환자에게 극심한 통증, 피로, 호흡곤란 등의 심각한 부작용과 합병증을 유발하여 삶의 질을 하락시킨다고 보고되고 있다(Amaral et al., 2020; Nagaiah et al., 2011; O'Neill and Shaha, 2013; Smallridge and Copland, 2010). 역형성 갑상선암의 새로운 치료법에 대한 연구가 여전히 지속되고 있으며, 이들 중 특히 천연물을 이용한 치료법이 부작용과 합병증을 최소화하고 치료 효과를 극대화할 수 있기 때문에 주목받고 있다(Ferrari et al., 2020; Jaskula-Sztul et al., 2011; Lan et al., 2017; Li et al., 2022; Saini et al., 2018; Sharifi-Rad et al., 2020; Shin et al., 2019; Yeo et al., 2014; Yeo et al., 2014; Yu et al., 2013).

감자(*Solanum tuberosum* Linnaeus)는 벼, 밀, 옥수수과 함께 세계 4대 작물로 알려져 있으며, 지방, 비타민, 단백질, 섬유질 및 기타 많은 영양소와 함께 탄수화물이 풍부해 훌륭한 식량자원으로 이용되어 오고 있다. 현재 전세계적으로 황색과 백색의 괴경을 가진 감자가 일반적이지만, 높은 유전적 다양성으로 인해 적색, 자색 등 다양한 색상의 유색감자도 존재한다(Burlingame et al., 2009; Yeo et al., 2014). 유색감자는 황색 및 백색을 띠는 일반 감자보다 폴리페놀 함량이 3배 더 높으며, carotenoid, anthocyanin과 같은 색소로 인해 다양한 색을 띠고 있다(Li et al., 2022; Petropoulos et al., 2019; Rasheed et al., 2022; Rytel et al., 2014). 특히 anthocyanin은 다른 유색감자들보다도 적색과 자색을 띠는 감자에서 함량이 더욱 높은 것으로 알려져 있다(Jansen and Flamme, 2006; Park et al., 2009). 최근 유색감자의 항산화, 항암, 항돌연변이 등의 다양한 생리활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Jang and Yoon, 2012; Kang and Choung, 2008; Lee et al., 2017; Park et al., 2008; Park et al., 2007; Petropoulos et al., 2019; Rasheed et al., 2022; Tsang et al., 2018). 하지만 아직 역형성 갑상선암세포에서의 유색감자에 의한 항암 효과 연구는 보고된 바가 없다.

그러므로 본 연구에서는 유색감자 홍영 에탄올 추출물의 항암 효과를 SNU-80 역형성 갑상선암세포에서 평가한 결과를 보고자 한다.

재료 및 방법

홍영 에탄올 추출물 조제

본 실험에서 사용한 홍영은 농촌진흥청에서 통상실시권을 실시하는 왕산종묘(강릉, 한국)에서 구입하였다. 구

입한 홍영은 껍질을 제거하고, 괴경을 3 mm 수준으로 자른 후, 시료 100 g에 80% 에탄올 1,000 mL을 첨가하여 24시간 동안 상온 추출하였다. 잔류물은 동일한 방법으로 2회 반복해 추출하였으며, 추출된 용액은 모두 합하여 여과하였다. 여과된 용액은 60°C rotary vacuum evaporator (EYELA N-1300, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후, 동결건조기(EYELA FDU-1200, Tokyo, Japan)로 동결건조하였다. 동결건조 한 홍영 에탄올 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 희석하여 50 mg/mL 농도로 준비하여 사용하였다.

세포 및 시약

SNU-80 역형성 갑상선암세포주는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 RPMI-1640 (Gibco-BRL Life technologies Inc., Grand Island, NY, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), 1% penicillin/streptomycin (Gibco-BRL)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 그리고 특별한 언급이 없는 시약은 모두 Sigma-Aldrich사의 최고 순도 등급 제품을 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-ciocalteu 방법을 이용해 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하였고, 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1,000 µg/mL로 희석하여 준비하였다. 96-well plate에 희석된 gallic acid와 50 mg/mL의 추출물을 well 당 4 µL씩 넣고, 동량의 Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma-Aldrich)와 180 µL의 증류수를 첨가하여 실온에서 5분 반응하였다. 2% Na₂CO₃ (DUKSAN Science, Seoul, Korea) 12 µL를 첨가해 40°C 배양기에서 30분 동안 암반응하였고, microplate reader (Molecular Devices, Sunnydale, CA, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 표준물질인 gallic acid로부터 얻은 검량곡선을 이용하여 구하였다.

세포 생존율 측정

세포 생존율을 조사하기 위해, EZ-3000 assay kit (DoGENBIO, Seoul, Korea)을 이용하여 측정하였다. SNU-80 세포를 96-well plate에 well당 2×10^4 개로 seeding하고 12시간 동안 배양한 후, 홍영 에탄올 추출물을 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000 µg/mL의 농도로 처리하였다. 그리고 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 24, 48, 72시간 동안 배양

Table 1. Primer sets for RT-PCR

Gene	Primer sequence (5' - 3')	Annealing temperature (°C)	PCR product size (bp)
MMP-2	F : GCGACAAGAAGTATCGCTTC R: TGCCAAGGTCAATGTCAGGA	58	390
MMP-9	F : CCATTTCGACGATGACGAGTT R: CTTGTCGCTGTCAAAGTTCGAG	58	530
GAPDH	F : GAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTC	58	226

하였다. 그 이후 MTS 용액을 세포배양액에 10 μ L/well을 첨가하고 1시간 동안 37°C 배양기에서 반응하여 microplate reader (Molecular Devices, Sunnydale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포주기 분석

SNU-80 세포를 60 mm culture dish에 1×10^6 cells/well로 분주하고 18시간 동안 배양한 후, 500, 750, 1,000 μ g/mL의 농도로 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 trypsin 처리하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후, 70% ethanol로 4°C에서 12시간 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 100 μ g/mL RNase A를 37°C에 30분 동안 처리하였다. 50 μ g/mL Propidium Iodide로 염색하고 CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Sciences, CA, USA)를 이용하여 세포주기를 확인하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포로부터 TRIzol 시약(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 1 μ g의 RNA를 ReverTra ACE PCR RT master mix kit (TOYOBO Co., Osaka, Japan)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 본 실험에서는 MMP-2/-9 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers (Table 1)을 사용하였고, housekeeping 유전자인 GAPDH 유전자를 internal control로 사용하였다. 증폭된 PCR 생성물은 0.5 μ g/mL ethidium bromide (Sigma-Aldrich)가 포함된 1.5% agarose (Sigma-Aldrich) gel에 전기영동하여 UV light 상에서 확인하였다.

Gelatin zymography

다양한 농도의 홍영 추출물과 중앙 촉진자로 잘 알려진 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 0.5 μ M 농도로

단독 또는 동시에 처리한 SNU-80 (1×10^6) 세포를 24시간 동안 배양한 후, 상층액을 모아 Ultra-4-Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore, Temecula, CA, USA)을 사용하여 농축하였다. 20 μ g 농도의 단백질은 non-reducing sample buffer (0.5 M Tris-Cl, pH 6.8, 5% SDS, 20% glycerol, 1% bromophenol blue)와 함께 혼합하여 1% gelatin이 포함된 10% sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel에서 전기영동 하였다. 전기영동 후, washing buffer (2.5% triton X-100)로 SDS를 제거하고, incubation buffer (1 M Tris-Cl pH 7.5, 1 M CaCl₂, 5 M NaCl, 0.02% NaN₃, 0.2 mM ZnCl₂, 2.5% triton X-100)로 37°C에서 12시간 동안 반응하였다. Gel은 coomassie brilliant blue (7% glacial acetic acid, 40% methanol, 0.25% coomassie blue)로 30분 동안 염색한 후, destaining solution (7% glacial acetic acid, 40% methanol)으로 탈색하여 white band를 확인하였다.

Annexin V 염색

SNU-80 세포를 60 mm culture dish에 1×10^6 cells/well로 분주하고 12시간 동안 배양한 후, 홍영을 다양한 농도로 처리하여 48시간 배양하였다. 세포를 모아 PBS로 세척한 후, Annexin V-FITC Apoptosis kit (Biovision Inc., Milpitas, CA, USA)를 사용하여 세포를 염색하였고, BD FACSAriaIII Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 분석기를 이용하여 측정하였다.

Western Blot analysis

홍영 추출물을 농도 별로 처리한 SNU-80 세포를 모아 PBS로 세척하고 lysis buffer (150 mM sodium chloride, 1.0% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris-Cl pH 8.0)을 첨가하여 4°C에서 15분간 반응한 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. Bradford법을 이용하여 단백질을 정량한 뒤,

Table 2. Yield and total polyphenol contents of Hongyong extract

Extract	Yield (%)	Total polyphenol (mg GAE/100 g)
Hongyong	3.73	292.43±8.42

50 µg의 단백질을 SDS-PAGE gel을 이용하여 분리하였다. 그 후, poly-vinylidene difluoride membrane에 transfer하여 5% skim milk가 함유된 TBS-T buffer (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)를 이용하여 실온에서 1시간 반응하였다. Caspase-3 (#9662; Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA), PARP (#9542; Cell signaling Technology), GAPDH (#AC002; Cell signaling Technology)를 1:1,000으로 희석한 후 첨가하여 4°C에서 12시간 반응하였으며, goat anti-mouse horseradish peroxidase(HRP)-conjugated IgG secondary antibody (#SA001; GenDEPOT, Barker, TX, USA)와 goat anti-rabbit HRP-conjugated IgG secondary antibody (#SA002; GenDEPOT)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. 그 후 enhanced chemilluminescence (ECL) kit (Amersham pharmacia Biotech Ltd., Amersham, UK)를 이용하여 측정하였다.

Statistical Analysis

세포 생존율 효과, RT-PCR, Gelatinase 활성, Western Blot 그리고 세포주기 분석은 Student's *t*-test를 실시하였다. 실험결과는 3회 반복 실험을 통하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 유의한 결과를 얻었다.

결과 및 고찰

홍영 에탄올 추출물의 수득률 및 총 폴리페놀 함량

100 g의 홍영 시료를 80% 에탄올을 이용하여 추출하였을 때의 수득률은 3.73%이다. 본 연구에서는 gallic acid를 표준물질로 홍영 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 그 결과 292.43±8.42 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g dry extract의 폴리페놀을 함유함을 확인하였다 (Table 2). 이는 유색감자의 총 폴리페놀 함량을 보고한 기존의 연구와 유사한 결과이다(Jang and Yoon, 2012; Alam et al., 2016).

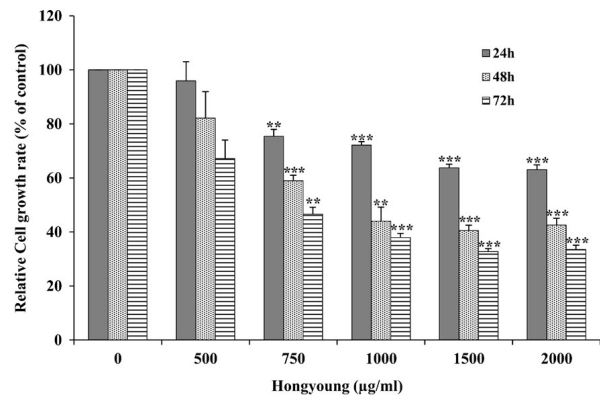


Fig. 1. Anti-proliferation effect of Hongyong on SNU-80 cells. The cells were treated with different concentrations of Hongyong for 24, 48 and 72 hr. Data represent the mean ± S.D. through three independent experiments (**; *P*<0.01 compared with untreated control, ***; *P*<0.001 compared with untreated control).

SNU-80 세포에서 홍영 에탄올 추출물 처리에 의한 생존율 분석

SNU-80 역형성 갑상선암세포에서 홍영 에탄올 추출물을 0, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000 µg/mL의 농도로 처리하여 24, 48, 72시간 동안 배양한 후, MTS 방법을 이용하여 세포의 생존율을 분석하였다. 대조군과 비교한 결과, SNU-80 세포의 생존율이 농도 의존적으로 감소하였고, 1,000 µg/mL의 농도에서는 세포 생존율이 50% 미만으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이는 홍영 추출물이 전립선암, 결장암, 백혈병, 구강암 등의 암세포에 대해 세포독성 효과가 있다는 기존의 연구와 유사한 결과이다(Kim et al., 2023; Park et al., 2008).

홍영 에탄올 추출물의 세포주기 조절 분석

홍영이 SNU-80 역형성 갑상선암세포의 세포분열 주기에 미치는 영향을 flow cytometry로 조사하였다. G1, S 그리고 G2/M기에 해당하는 대조군세포에서는 각각 77.31%, 5.38% 그리고 14.33%의 분포를 보였다. 반면에 1,000 µg/mL 농도의 홍영 추출물을 처리했을 때는 G1기가 51.73%로 감소하였고, S기는 9.30% 그리고 G2/M기는 24.25%로 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 이상의 결과로 보아 S 및 G2/M기 arrest가 발생했음을 확인하였으며 또한 대조군세포에서 sub-G1기는 1.99%였지만, 500 µg/mL에선 2.31%, 750 µg/mL에서는 3.81%, 1,000 µg/mL에서는 6.90%로 확연히 증가함을 관찰할 수 있었다. 이는 천연물 추출물 처리에 의한 역형성 갑상선암세포에서 나타난 세포주

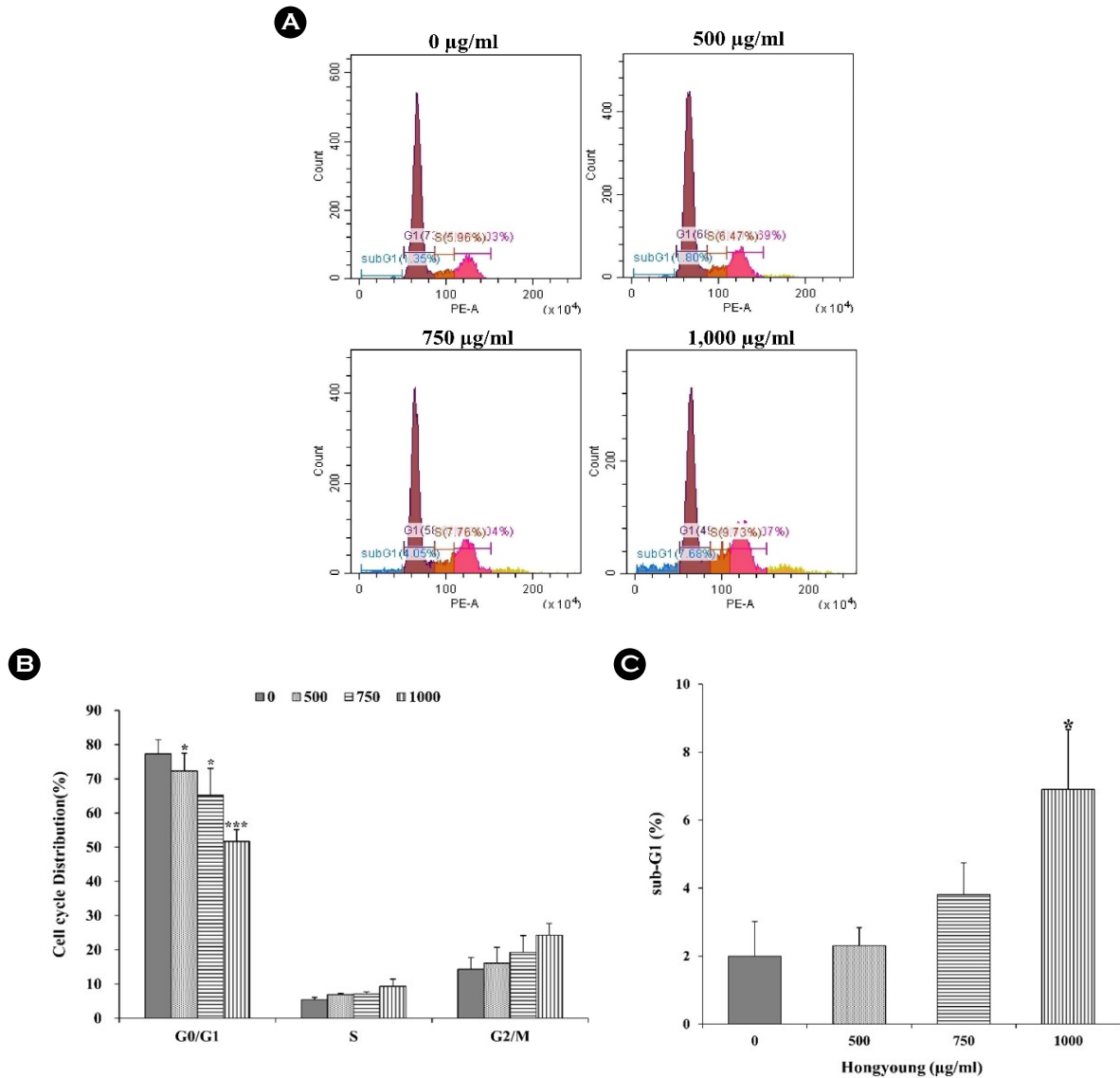


Fig. 2. Cell cycle analysis of Hongyong on SNU-80 cells. The cells were treated at different concentrations of Hongyong for 48 hr. (A) The cell cycle profiles were analyzed by FACS using CytExpert Software. (B) The percentage of cells in each phase of the cell cycle is represented by G0/G1, S, and G2/M phase. (C) The percent of sub-G1 phase (apoptotic cells) were plotted. Data represent the mean \pm S.D. through three independent experiments (*; $P < 0.05$ compared with untreated control, ***; $P < 0.001$ compared with untreated control).

기에 대한 기존 연구를 뒷받침하고 있다(Kim et al., 2023).

홍영 추출물의 MMP-2 및 MMP-9의 암전이 억제 효과

암세포의 침습 및 전이에 주된 역할을 하는 세포외 기질 금속함유 단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)는 세포외 단백질을 표적으로 절단하는 아연 의존성 내인성 peptidase이다. MMP는 기저막을 구성하는 단백질을 분해해 혈관 및 림프관으로 암세포의 이동을 촉진하며, 종양의 초기 성장 및 전이에도 관여함이 밝혀졌다(Ann

and Lynn, 1997; Jacob and Prekeris, 2015). MMP는 기질 선호도에 따라 type IV collagenase, stromelysin, interstitial collagenase 등으로 구분하며, MMP-2(gelatinase A, 분자량 72 kDa)와 MMP-9(gelatinase B, 분자량 92 kDa)은 기저막을 구성하는 type IV collagen을 분해해 침습을 유도하는 type IV collagenase에 해당된다(Bassiouni et al., 2021; Liotta and Stetler-Stevenson, 1991).

SNU-80 세포에 홍영 추출물을 500, 750, 1,000 µg/mL의 농도로 처리하여 MMP-2와 MMP-9의 유전자 발현 억제

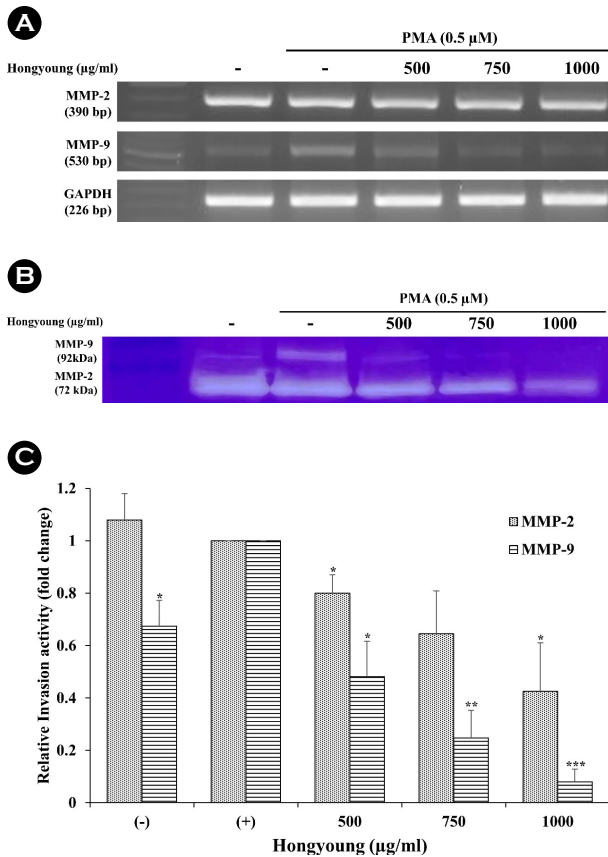


Fig. 3. Effect of Hongyong on the expression of MMP-2/9 in PMA-treated SNU-80 cells. (A) Effect of Hongyong on the activities of MMP-2/9 mRNA in PMA-treated SNU-80 cells. (B) The activity of MMP-2/9 protein were determined by gelatin zymography in conditioned media. (C) The relative expression of MMP-2/9 were analyzed by band intensity using ImageJ program. Data represent similar results from three independent experiments (*; $P < 0.05$ compared with only PMA-treated cells, **; $P < 0.01$ compared with only PMA-treated cells, ***; $P < 0.001$ compared with only PMA-treated cells).

효과를 대조군과 비교한 결과, 농도 의존적으로 발현이 억제됨을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 SNU-80 세포에 대한 홍영 추출물의 MMP-2/9 단백질 활성 억제를 통해 암전이 억제에 미치는 효과를 조사하기 위해, 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 홍영 추출물을 처리하여 MMP-2의 활성 억제 효과를 대조군과 비교하였다. 그 결과, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 1.25배, 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 1.55배, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 2.35배 감소를 보였다. 그리고 MMP-9의 활성 억제 효과를 대조군과 비교하였을 때, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 2.08배, 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 4.05배, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 12.49배 감소를 보였다(Fig. 3B). 이러한 결과를 통하여 대조군에 비해, 홍영 추출물을 처리한 세포에서는 MMP-2와 MMP-9의 유전자 및

단백질 활성이 유의하게 감소하였으며 무엇보다 MMP-9의 유전자 및 단백질 활성에 대한 억제 효과가 높음을 확인할 수 있었다. 이는 홍영 추출물 처리에 의한 암세포에서 나타난 MMP-2/9에 대한 연구와 유사한 결과이다(Kim et al., 2023).

홍영 추출물의 apoptosis 분석

Annexin V 단백질은 정상적으로는 세포막 내측에 위치하였다가 apoptosis가 진행되면 세포막 외측으로 전위되는 phosphatidylserine에 결합하는 성질을 가지고 있어 apoptosis를 확인하는데 사용된다. 본 연구에서는 홍영 추출물에 의한 SNU-80 세포의 apoptosis 유도를 알아보기 위하여 홍영 추출물을 500, 750, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 48시간 동안 처리한 후 Annexin V와 Propidium iodide 염색으로 조사하였다. 대조군에 비해 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 Annexin V에 염색된 apoptosis 초기 단계의 세포가 약 6배 증가하였다(Fig. 4).

Apoptosis는 세포 내 관련 단백질에 의해 조절되는데, 대표적으로 Bcl-2 family, caspase-3, PARP 등이 가장 잘 알려져 있다. 세포 내 자극 등의 이유로 apoptosis 기전이 유발되며 미토콘드리아 내의 cytochrome c가 방출되고, caspase cascade가 활성화되어 궁극적으로는 caspase-3가 활성화된다. 이때 DNA 복구에 관여하는 DNA-binding zinc finger protein인 PARP는 활성화된 caspase-3에 의해 fragmentation이 발생되고, 이로 인해 apoptosis가 일어나게 된다. 따라서 SNU-80 세포에 세포사멸 유도 경로를 확인하기 위해 관련 단백질인 caspase-3, PARP의 발현양을 확인하였다. 그 결과 pro-caspase-3와 PARP의 발현이 농도 의존적으로 감소하였고, cleaved caspase-3와 fragmented PARP가 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이와 같은 결과를 통해 홍영 추출물이 SNU-80 세포에서 apoptosis가 유도됨을 확인할 수 있었다. 이는 천연물 추출물 처리에 의한 역형성 갑상선암세포에서 나타난 apoptosis에 대한 연구결과들을 뒷받침 하고 있다(AI-Mohanna et al., 2023; Allegri et al., 2018; Hong et al., 2014; Jung and Hwang, 2021; Yeo et al., 2014; Yeo et al., 2014).

본 연구는 SNU-80 역형성 갑상선암세포에서의 홍영 추출물 처리를 통한 암세포 성장 억제, 세포사멸 및 암전이 억제 능력을 확인하였다. 홍영 추출물 처리는 50% 이상의 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타냈으며, S기와 G2/M기는 증가하고 G1기는 감소하였고, 세포사멸 능력을 나타내는 sub-G1기의 비율은 2배 이상 증가함을 관찰하

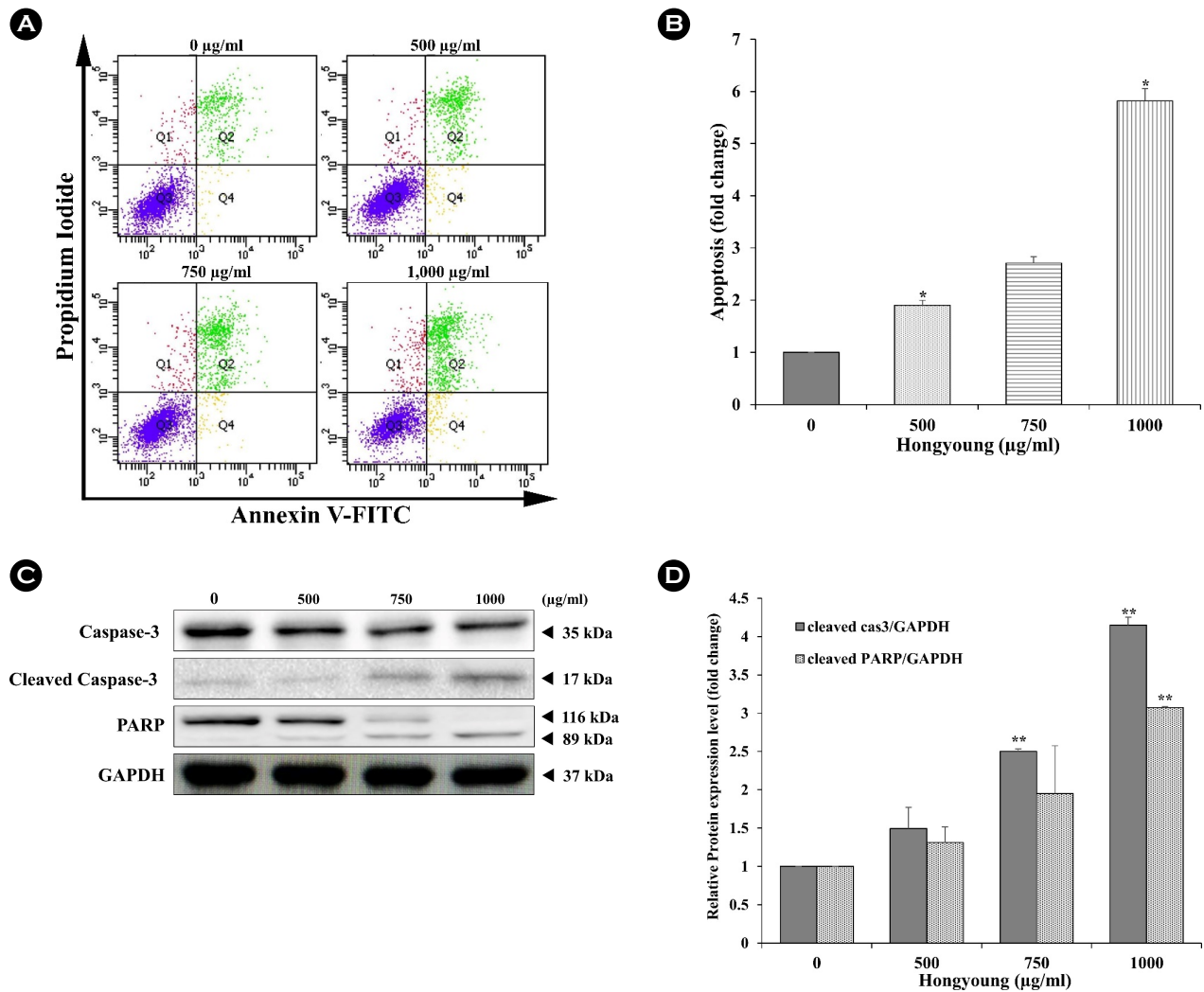


Fig. 4. Effect of Hongyong on apoptosis in SNU-80 cells. (A) Annexin V/Propidium iodide (PI) double staining assay detected by flow cytometry. The cells were treated with Hongyong (500~1,000 µg/mL) for 48 hr. (B) Relative amount of FITC-Annexin V-positive (apoptotic) cells. Data represent similar results from three independent experiments (*, $P < 0.05$ compared with untreated control). (C) Western Blot analysis of (cleaved) caspase-3 and (fragmented) PARP proteins in SNU-80 cells. The cells were treated with Hongyong at the indicated concentrations for 48 hr. (D) Relative protein expression of cleaved caspase-3 and fragmented PARP. Data represent similar results from three independent experiments (**; $P < 0.01$ compared with untreated control).

였다. 또한, MMP-2 및 MMP-9의 유전자 발현 및 단백질 활성 감소를 통한 높은 암전이 억제 활성을 확인하였다. 홍영 추출물을 처리하였을 때 apoptosis 초기 단계의 세포가 유의미하게 증가하였으며, apoptosis와 관련된 단백질인 caspase-3, PARP의 발현양을 확인함으로써 홍영 처리로 인해 apoptosis가 진행됨을 확인하였다. 종합적으로, 이와 같은 연구결과는 SNU-80 역형성 갑상선암세포에서 홍영 추출물의 항암 효과를 확인하였으며 향후 이와 같은 처리에 대한 추가적인 효능 및 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENT

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

REFERENCES

Al-Mohanna M, Alraouji NN, Alhabardi SA, et al. The curcumin

- analogue PAC has potent anti-anaplastic thyroid cancer effects. *Sci Rep*. 2023. 13: 4217.
- Alam MK, Rana ZH, Islam SN. Comparison of the proximate composition, total carotenoids and total polyphenol content of nine orange-fleshed sweet potato varieties grown in Bangladesh. *Foods*. 2016. 5: 64.
- Allegri L, Rosignolo F, Mio C, Filetti S, Baldan F, Damante G. Effects of nutraceuticals on anaplastic thyroid cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018. 144: 285-294.
- Amaral M, Afonso RA, Gaspar MM, Reis CP. Anaplastic thyroid cancer: How far can we go?. *Excli J*. 2020. 19: 800-812.
- Ann FC, Lynn MM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1997. 89: 1260-1270.
- Bassiouni W, Ali MAM, Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J*. 2021. 288: 7162-7182.
- Burlingame B, Mouillé B, Charrondièrre R. Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *J Food Compos Anal*. 2009. 22: 494-502.
- Ferrari SM, Elia G, Ragusa F, et al. Novel treatments for anaplastic thyroid carcinoma. *Gland Surg*. 2020. 9: S28-S42.
- Hong JM, Park CS, Nam-Goong IS, et al. Curcumin enhances docetaxel-induced apoptosis of 8505C anaplastic thyroid carcinoma cells. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2014. 29: 54-61.
- Jacob A, Prekeris R. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Front Cell Dev Biol*. 2015. 3: 4.
- Jang HL, Yoon KY. Biological activities and total phenolic content of ethanol extracts of white and flesh-colored *Solanum tuberosum* L. potatoes. *J Kor Soc Food Sci Nutr*. 2012. 41: 1035-1040.
- Jansen G, Flamme W. Coloured potatoes (*Solanum tuberosum* L.) - Anthocyanin content and tuber quality. *Genet Resour Crop Evol*. 2006. 53: 1321-1331.
- Jaskula-Sztul R, Pisamturakit P, Landowski M, Chen H, Kunnimalaiyaan M. Expression of the active Notch1 decreases MTC tumor growth *in vivo*. *J Surg Res*. 2011. 171: 23-27.
- Jung HW, Hwang JH. Anticancer effects of Ursi Fel extract and its active compound, ursodeoxycholic acid, in FRO anaplastic thyroid cancer cells. *Molecules*. 2021. 26: 5309.
- Kang SC, Choung MG. Comparative study on biological activities of colored potatoes, Hongyoung and Jayoung cultivar. *Kor J Crop Sci*. 2008. 53: 233-238.
- Kim EJ, Hwang SH, Park SW. Anti-tumor effect of a combination of Hongyoung ethanol extract and cisplatin in YD-10B oral cancer cells. *J Life Sci*. 2023. 33: 498-505.
- Lan L, Basourakos S, Cui D, et al. ATRA increases iodine uptake and inhibits the proliferation and invasiveness of human anaplastic thyroid carcinoma SW1736 cells: Involvement of β -catenin phosphorylation inhibition. *Oncol Lett*. 2017. 14: 7733-7738.
- Lee W, Yeo Y, Oh S, et al. Compositional analyses of diverse phytochemicals and polar metabolites from different-colored potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Food Sci Biotechnol*. 2017. 26: 1379-1389.
- Li Y, Zhang J, Zhou H, Du Z. Anticancer effects of natural phytochemicals in anaplastic thyroid cancer (Review). *Oncol Rep*. 2022. 48: 156.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res*. 1991. 51: 5054s-5059s.
- Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Oncol*. 2011. 2011: 542358.
- O'Neill JP, Shaha AR. Anaplastic thyroid cancer. *Oral Oncol*. 2013. 49: 702-706.
- Paes JE, Ringel MD. Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008. 37: 375-387.
- Park JW. Thyroid tumorigenesis. *J Endocr Surg*. 2010. 10: 79-87.
- Park YE, Cho JH, Cho HM, Yi JY, Seo HW, Choung MG. A new potato cultivar "Hongyoung", with red skin and flesh color, and high concentrations of anthocyanins. *Kor J Bread Sci*. 2009. 41: 502-506.
- Park YE, Jeong JC, Cho HM, et al. Antimutagenic effect and cytotoxicity to human cancer cell lines of colored potato extracts. *Kor J Crop Sci*. 2008. 53: 75-84.
- Park YE, Jeong JC, Hwang YS, et al. Antioxidant and inhibition on angiotensin converting enzyme activity of colored potato extracts. *Kor J Crop Sci*. 2007. 52: 447-452.
- Petropoulos SA, Sampaio SL, Gioia FD, et al. Grown to be blue-antioxidant properties and health effects of colored vegetables. Part I: Root Vegetables. *Antioxidants (Basel)*. 2019. 8: 617.
- Rasheed H, Ahmad D, Bao J. Genetic diversity and health properties of polyphenols in potato. *Antioxidants (Basel)*. 2022. 11: 603.
- Rytel E, Tajner-Czopek A, Kita A, et al. Content of polyphenols in coloured and yellow fleshed potatoes during dices processing.

- Food Chem. 2014. 161: 224-229.
- Saini S, Tulla K, Maker AV, Burman KD, Prabhakar BS. Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective. *Mol Cancer*. 2018. 17: 154.
- Sharifi-Rad J, Rajabi S, Martorell M, et al. Plant natural products with anti-thyroid cancer activity. *Fitoterapia*. 2020. 146: 104640.
- Shin HJ, Hwang KA, Choi KC. Antitumor effect of various phytochemicals on diverse types of thyroid cancers. *Nutrients*. 2019. 11: 125.
- Smallridge RC, Copland JA. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010. 22: 486-497.
- Tsang C, Smail NF, Almoosawi S, McDougall GJM, Al-Dujaili EAS. Antioxidant rich potato improves arterial stiffness in healthy adults. *Plant Foods Hum Nutr*. 2018. 73: 203-208.
- Volante M, Lam AK, Papotti M, Tallini G. Molecular pathology of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer: What do pathologists need to know? *Endocr Pathol*. 2021. 32: 63-76.
- Yeo HS, Lee MH, Choi YK, Jeon CY, Park JH. Antineoplastic effect of several herbal medicine mixtures on SNU-80 Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Line. *J Int Kor Med*. 2014. 35: 416-427.
- Yeo HS, Lee MH, Ko SG, Choi YK, Jeon CY, Park JH. Antineoplastic effect of several herbal medicines on SNU-80 anaplastic thyroid carcinoma cell line. *Soc Prev Kor Med*. 2014. 18: 83-92.
- Yu XM, Jaskula-Sztul R, Ahmed K, Harrison AD, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Resveratrol induces differentiation markers expression in anaplastic thyroid carcinoma via activation of Notch1 signaling and suppresses cell growth. *Mol Cancer Ther*. 2013. 12: 1276-1287.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.4.321>

Cite this article as: Kim G, Kim EJ. *In Vitro* Evaluation of Anti-cancer Properties of Hongyoung on SNU-80 Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Line. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 321-329.