

Pycnogenol이 HT29 결장암세포의 성장과 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) mRNA의 발현에 미치는 영향

남부대학교 식품생명과학과

이 정 민

Effect of Pycnogenol on the Growth Inhibition of HT29 Colon Adenocarcinoma Cells and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) mRNA Expression

Jeongmin Lee

Department of Food & Life Sciences, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

Pycnogenol (PYC) is a standardized extract from the French maritime pine bark that consists of a concentrate of polyphenols. The purpose of this study was to investigate the effect of PYC on the growth inhibition of HT29 colon adenocarcinoma cells and iNOS mRNA expression level. PYC treatment at 30 μ g/ml for 24 hr significantly induced the growth inhibition of HT29 cells. It was observed to occur in a dose-dependent manner. PYC treatment at 50 and 100 μ g/ml has inhibited HT29 cell growth by 83% and 98%, respectively. In estimation of iNOS mRNA expression level by RT-PCR, it was induced at 30 μ g/ml and increased by increment of PYC concentration. We assume that PYC treatment may, at least in part, attribute to induce iNOS to generate peroxynitrite (ONOO⁻) resulting in the growth inhibition of HT29 cells.

Key Words: Pycnogenol, HT29, iNOS, Growth inhibition, Peroxynitrite (ONOO⁻)

서 론

한국인의 사망의 주요 원인으로 인식되어져 온 암의 치료에 대한 연구는 지난 수십년간 꾸준히 연구되어 오고 있다. 특히 유전자 치료법의 제안이나 새롭게 개발된 화학물질의 효과는 과거 어느 때보다 연구자들의 관심 대상이 되고 있다.¹⁾ 하지만 그 부작용 또한 무시할 수 없는 요소로 등장하게 되고 또한 암의 발생에 영향을 미치는 환

경요인의 하나로서 식품의 영양성분이 중요한 조절인자로 알려짐에 따라 식품이나 천연물질을 중심으로 한 발암성분 및 항암성분에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

암세포의 성장억제는 고사(apoptosis) 등에 의해 일어날 수 있으며 주요 조절 인자로서 nitric oxide (NO)가 있다. NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되며 주로 상피세포조직이나 신경세포에서 NOS의 isoforms은 일정하게 발현되고 nanomolar 단위의 NO를 생성하기 위해 세포내 Ca²⁺과

calmoduline을 필요로 한다. Inducible nitric oxide (iNOS)는 cytokine이나 박테리아의 대사산물에 의해 자극되어 주로 macrophage, hepatocyte, endothelial cell, chondrocyte 등에서 다량의 NO (micromolar 단위)를 생성하는데 역할을 하고 있다.²⁾ 최근 들어 iNOS는 여러 종류의 암세포에서도 발현이 되는 것이 알려졌지만 그 역할에 대해서는 논란의 대상이 되고 있다. 특히 암세포의 성장을 촉진하거나 또는 억제하는 지의 여부는 주요한 논쟁의 하나가 되고 있으며 암세포에서 발현된 iNOS가 암세포의 성장에 중요한 역할을 할 것으로 인식되어 지지만 오히려 암세포의 apoptosis를 유도하여 성장을 억제할 것으로 여겨질 것으로 보고되기도 하며 이것은 실험에 사용된 암세포에서 발현된 NO의 양이나 유전적 배경 등에 의해 차이가 나는 것으로 여겨지고 있다.^{3,4)}

Pycnogenol (PYC)는 French maritime pine bark (*Pinus pinaster* Ait.)에서 추출한 물질로서 다량의 polyphenol을 함유하고 있다.⁵⁾ 주성분으로서 catechin과 epicatechin을 단위로 하는 procyanidine으로 구성되어 있고 이외에 taxifolin과 여러종류의 phenolic acid로 구성된 bioflavonoids를 함유하고 있다. 현재까지 연구된 PYC의 생리작용은 항산화제, 대사생리조절, 세포기능조절, LDL 산화억제, 지질산화억제, 항염증 작용등으로 요약될 수 있다.⁶⁻⁸⁾ Lee 등의 최근 보고에 의하면 PYC는 nude mouse에서 2차 흡연으로 인한 폐의 손상과 장기조직에서 지질 및 염증 관련 사이토카인의 발현을 억제한 것으로 보고하였고⁹⁾ 24주간의 임상실험에서 혈액내의 백혈구에서 NF- κ B의 발현을 억제하였음을 보고하였다.¹⁰⁾ 현재까지 PYC는 항산화물질로서의 역할에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있지만 아직 암세포에 대한 영향과 특히 암세포에서 발현되는 iNOS와의 상호관계에 대한 연구는 아직 수행된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 HT29 결장암세포의 성장에 미치는 PYC의 역할과 iNOS 발현과의 관계를 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1) 재료

HT29 세포 (HTB 39)는 American Type Culture

Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 배양에 사용된 Macoy's 5A, fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, 1M HEPES, L-glutamine, non-essential amino acid (NEAA)는 BioWhitaker (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 RNA 추출을 위해 RNeasy kit를 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. RT-PCR에 사용된 MLV-RT reverse transcriptase와 Taq polymerase는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 필요한 PYC는 Swiss Horphag 사로부터 분양받아 사용하였다.

2) 세포배양

HT29 결장암 세포는 Macoy's 5A 배지를 사용하여 37°C 습윤한 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험에 사용할 세포의 유지를 위해 Macoy's 5A 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, 2 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1× NEAA를 첨가하여 사용하였다. 세포가 80% confluency에 이르면 PBS (pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양 하였고 배지는 3일마다 교환하였다.

3) 세포성장 변화 측정

PYC의 HT29 세포의 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해 1×10⁵ cells/well의 밀도로 24-well plate에 분주하였다. 1시간 후 세포가 plate에 밀착된 것을 확인한 다음 10 mg/ml 농도의 PBS에 녹인 PYC 농축 용액으로부터 최종농도가 0, 10, 20, 30, 50, 100 μ g/ml 되도록 각 well에 첨가하여 24시간 37°C 습윤한 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. PBS로 세포의 단층을 세척한 후 세포의 형상을 inverted microscope (Olympus, Japan)로 촬영하였다. MTT assay를 위해서는 5×10³ cells/well의 밀도로 96-well plate에 세포를 분주한 후 세포형상 관찰을 위한 방법과 동일하게 PYC를 처리하여 6시간 경과 후 MTT assay로 살아 있는 세포수를 측정하였다.

4) iNOS mRNA의 발현 측정

HT29 세포를 60-mm petridish에 5×10^6 cells/well의 밀도로 분주한 후 최종농도가 0, 10, 20, 30, 50, 100 ug/ml 되도록 각 60-mm petridish에 첨가하여 24시간 37°C 습윤한 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하였다. cDNA의 합성을 위해 5 ug의 total RNA에 200 unit의 MLV-RT reverse transcriptase와 500 ng oligo-dT primer를 첨가하여 42°C에서 60분간 수행하였다. PCR 반응을 위해 사용한 iNOS primer sequence는 forward; 5'-CCG

AGGCAAACAGCACATTCAG-3', reverse; 5'-GG TTGGGGGTGTGGTGATGTC -3'(462 bp)이며 internal control로서 GAPDH를 사용하였고 primer sequence는 forward; 5'-CCATGAGAAGTATGAC AACAGCC-3', reverse; 5'-TGCCAGGTTTTTCTA GACGG -3'(353 bp)이다. PCR을 위한 혼합액은 2 ul의 cDNA, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTP, 10× reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primers를 섞어 95°C에서 5분간 hot start 한 후 94°C에서 30초간, 55°C에서 1분, 72°C에서 30 초간 35 cycling 으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 polishing step을 거쳐 PCR product를 얻었다. 5 ul PCR product를 1.5% aga-

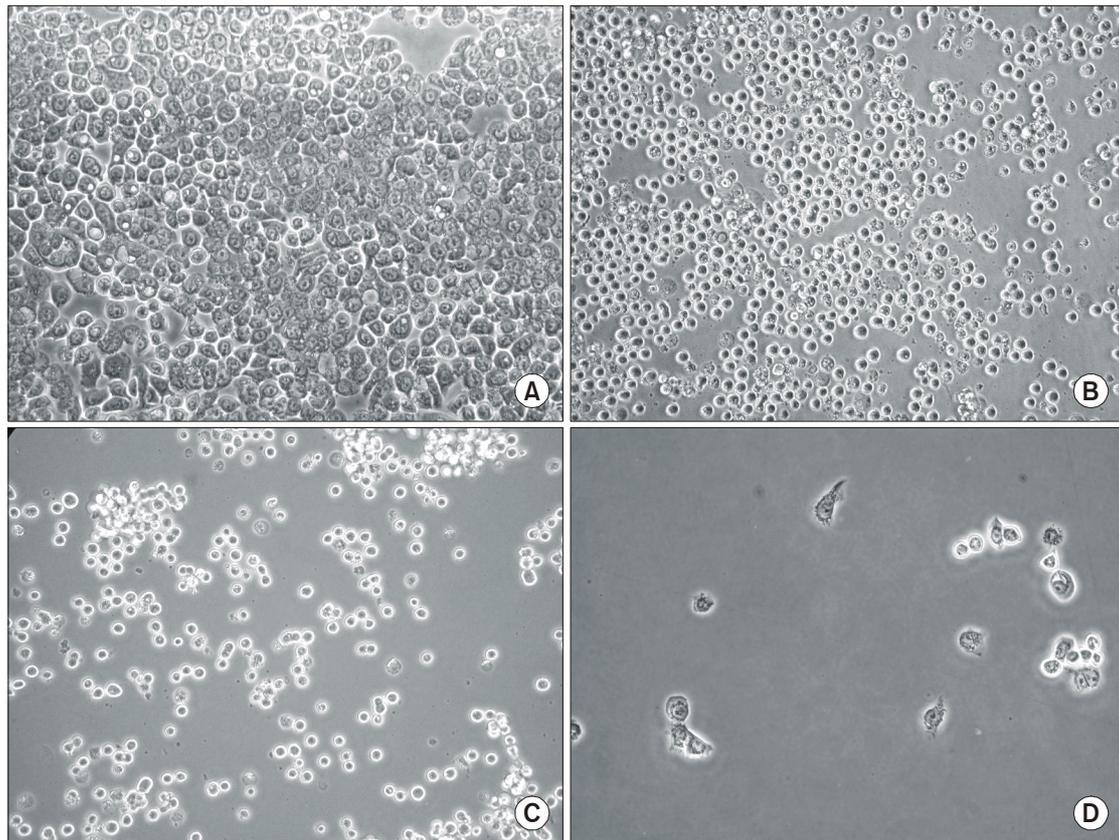


Fig. 1. The growth inhibition of PYC on HT29 colon adenocarcinoma cells. The cells were plated onto each well with 5×10^5 cells/ml. Cell morphology was photographed by inverted microscope. (A) control, (B) 30µg/ml PYC, (C) 50µg/ml PYC, (D) 100µg/ml PYC.

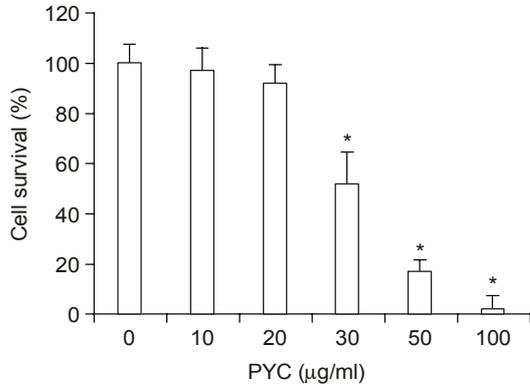


Fig. 2. Effect of PYC on viable HT29 colon adenocarcinoma cell number. HT29 cells were plated in 96-well plate at 5×10^3 cells/well and cell number was estimated by the MTT assay. *: means the significant difference ($p < 0.05$) tested by Student's t test compared to control group (0µg/ml).

rose gel에서 전기영동하여 EtBr로 20분간 염색한 후 UV에서 band를 확인하여 NIH Image analyser로 발현량을 비교 분석하였다. 이때 GAPDH mRNA의 발현량을 기준으로 하여 백분율로 나타내었다.

결 과

1) PYC의 HT29 결장암세포의 성장에 미치는 영향

Inverted microscope에서 HT29세포의 형상을 관찰한 결과 10~20µg/ml PYC의 처리는 HT29세포에 큰 영향을 미치지 못하였으나 30µg/ml의 경우 다소 세포의 수가 줄어들고 세포의 형상도 일정하지 않게 cluster를 형성하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 50~100µg/ml의 농도에서는 급격히 세포의 수가 줄어들고 세포의 형태도 정상대조군 (0µg/ml)에 비해 차이가 있음을 알 수 있다. MTT assay의 경우도 유사한 결과를 얻었다(Fig. 2). 30µg/ml PYC 처리군에서 생존한 세포의 수는 감소하기 시작하여 50µg/ml 농도의 PYC 처리한 경우는 급속히 감소하여 거의 생존한 세포의 수를 구하기 어려웠다.

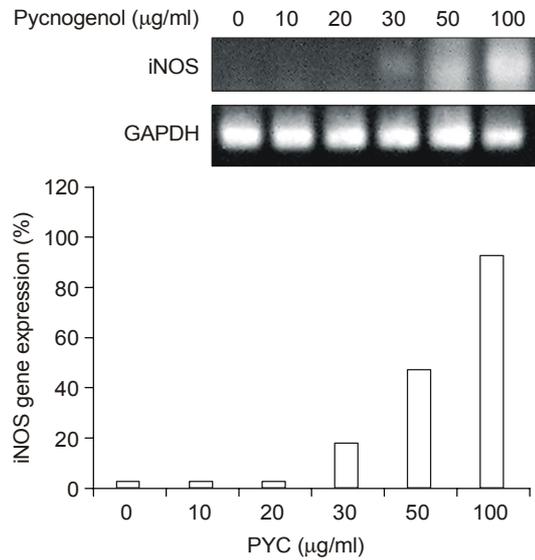


Fig. 3. Effect of PYC on expression of iNOS mRNA expression level in HT29 colon adenocarcinoma cells. Total RNA was extracted after 24 hour with PYC treatment at different concentration. iNOS mRNA level was determined by RT-PCR and expressed as percent unit (%) by normalization with a following equation; (iNOS level/GAPDH level)×100.

2) PYC의 HT29 결장암세포에서 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향

HT29세포주에서 iNOS mRNA의 발현에 미치는 PYC의 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과를 Fig. 3에서 나타내었다. 본 실험에서 HT29 세포 정상대조군에서는 iNOS의 발현을 확인할 수 없었다. 하지만 30µg/ml의 농도에서 확인되기 시작하여 농도가 증가할 수록 급격한 iNOS mRNA 발현을 확인할 수 있었다.

고 찰

PYC는 항산화제로서 지난 10년간 연구되어 왔으며 그 기능성이 새롭게 밝혀지고 있다. 특히 Jeanne 등에 의해 발표되었듯이 쥐의 AIDS 모델에서 나타난 면역학적인 결손현상, 즉 T&B 세포의 mitogenesis 감소, Th1 type cytokines (IL-2, IFN-γ)

과 Th2 type cytokines (TNF- α , IL-4, IL-6)의 pattern 변화, 그리고 간에서의 지질산화로 인한 세포 손상을 억제하는데 중요한 역할을 하였다.¹¹⁾ Saeed 등은 6개월간 PYC 투여 임상시험에서 고혈압을 저하시키는 기능이 있다는 것을 확인하였다.¹⁰⁾ 이것은 PYC의 항산화력 뿐만 아니라 혈관 확장이나 혈압조절인자들에 영향을 미칠 수 있는 또 다른 생리조절 기능이 존재함을 암시한다. 하지만 아직까지 PYC를 암세포에 적용한 사례가 거의 없어서 본 실험의 결과는 PYC의 생리활성 연구에 대한 새로운 시도라 하겠다.

암은 개시단계, 촉진단계, 전이단계를 거쳐 발생하며 암의 진행과 억제에는 여러 환경요인에 의해 영향을 받는다. 중요한 환경요인으로 식품이 대두되면서 기존의 항암치료제를 대신 또는 보충할 수 있는 부작용이 적은 신물질 개발이 꾸준히 이루어지고 있다. 암세포는 정상세포와는 달리 그 성장 속도가 급격하게 증가함으로 암세포의 성장 억제는 암의 치료에 중요한 부분을 차지할 수 있다. 아직 발표하지 않은 결과에 의하면 정상세포이며 monocytic 세포인 THP-1에 대한 PYC의 성장 저해효과를 확인한 결과 100 μ g/ml에서 성장 억제함을 알 수 있었다. 이것은 Fig. 2에서 나타나듯이 HT29 암세포의 성장을 억제하는데 필요한 PYC의 농도가 30 μ g/ml인 것을 감안하면 정상세포에 비해 암세포가 PYC에 의해 선택적으로 성장저해되었음을 알 수 있다. Huynh의 연구에 의하면 사람의 가슴 정상세포인 MCF-10과 유방암세포 MCF-7에 대한 PYC의 성장저해 효과를 연구한 결과 40 μ g/ml의 농도에서 MCF-10에는 영향이 없이 MCF-7 암세포에만 선택적으로 성장을 저해하였다.¹²⁾ 이러한 결과는 본 실험에서 수행된 것과 유사한 농도에서 얻어진 결과임과 동시에 암세포에 선택적 성장억제가 있는 것은 HT29 암세포를 이용한 결과와도 일치하고 있다.

암세포에서의 iNOS 발현은 여러 보고에 의해 이미 확인된 바 있다. 하지만 암세포에서의 iNOS의 역할에 대해서는 상충된 의견이 대두되고 있어 관심을 끌고 있다. 암세포에서 발현된 iNOS에 의해 생성된 ONOO \cdot 는 주위의 세포에 작용하여 독성을 나타내거나 유전자에 mutagenesis를 유발시켜 암을 촉진시키는 것으로 알려진 반면, 암세

포의 apoptosis를 유도하여 암세포의 성장이나 전이를 억제시킬 수 있다는 보고도 함께 되고 있다.³⁾ 본 실험에서는 다른 보고와는 달리 HT29 정상대조군에서 iNOS mRNA의 발현을 확인할 수 없었다. 다른 암세포와 iNOS 발현에 대한 보고와 비교할 때 차이가 나는 것은 암세포의 종류에 따라 iNOS가 발현되는 pattern이 다를 수 있기 때문으로 여겨진다. 10~20 μ g/ml의 PYC 처리에서는 영향을 미치지 못하였으나 PYC 농도를 증가할수록 iNOS mRNA의 발현이 급격히 증가하여 iNOS mRNA의 발현이 농도의존적임을 알 수 있었다. Huang의 연구에 의하면 혈액암종인 HL-60, U937, K562에 대한 성장억제 연구에서 각 PYC 150, 40, 100 μ g/ml (IC₅₀)의 농도에서 암세포의 성장이 억제되었고 HL-60의 경우 50, 100, 125 μ g/ml PYC 농도에서 농도 의존적, 배양시간 의존적으로 apoptosis가 유발되었음을 보고하였다.¹³⁾ 이러한 연구는 본 연구에서 얻어진 결과와 유사하며 동일하게 농도의존적인 경향을 보였다. 하지만 본 연구만으로는 PYC로 인해 과다 발현된 iNOS가 암발생 과정 중 어느 단계에 영향을 미쳤는지 혹은 암세포에 apoptosis를 유발하였는지 또는 어떤 기작에 의해 apoptosis가 일어났는지 직접 확인할 수는 없었지만 PYC가 암세포 성장억제를 한 가능한 경로를 2가지로 요약할 수 있다. 첫째, iNOS에 의해 생성된 NO는 O₂와 결합하여 세포독성이 강한 ONOO \cdot 를 생성하고 peroxyntrous acid로 전환되는데 이것은 다시 nitrogen dioxide와 OH로 분해되어 \cdot OH (hydroxyl radical)을 형성한다. 이렇게 형성된 \cdot OH는 강한 산화성을 나타내어 세포사에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. 하지만 다른 산화성 라디칼 (O \cdot^- , H₂O₂)에 비해 수명이 짧기 때문에 핵막을 통과하여 세포사의 원인 중 하나인 DNA 절단에 영향을 미치기는 어려울 것으로 사료된다. 둘째, ONOO \cdot 는 poly ADP ribosyl transferase의 활성화를 통해 세포의 에너지 고갈과 미토콘드리아의 칼슘을 유출시켜 세포사를 유도할 뿐 아니라 미토콘드리아의 전자전달과 호흡을 저해할 수 있다.¹⁴⁾ 따라서 본 실험에서 PYC의 암세포성장억제에 대한 역할은 내인성 ONOO \cdot 의 형성을 통해 세포사를 유도한 것으로 사료된다.

결 론

PYC 처리에 대한 HT29 암세포의 성장억제와 iNOS mRNA 발현은 농도 의존적으로 나타났으며 HT29 대조군에서는 iNOS mRNA의 발현을 확인할 수 없었다. PYC의 처리로 인한 iNOS의 발현이 HT29 암세포 성장억제와 직접적인 관련이 있는지는 확인할 수 없었지만 ONOO⁻ 생성을 통해 apoptosis에 영향을 미쳤으리라 사료되며 향후 그 가능한 기작에 대해 연구할 필요성이 있다고 하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
- 2) Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1994; 198: 249-258.
- 3) Wang B, Xiong Q, Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Xi K. Intact nitric oxide synthase II gene is required for interferon-beta-mediated suppression of growth and metastasis of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 71-75.
- 4) Wang B, Xiong Q, Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Xi K. Genetic disruption of host nitric oxide synthase II gene impairs melanoma-induced angiogenesis and suppresses pleural effusion. *Int J Cancer* 2001; 9: 607-611.
- 5) Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Wurthwein G, Rohdewald P. Pycnogenol, French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients. *Life Sci* 2004; 74: 855-862.
- 6) Grimm T, Schafer A, Hogger PF. Antioxidant activity and inhibition of matrix metallo-proteinase by metabolites of maritime pine bark extract. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 811-822.
- 7) Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schonlau F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* 2002; 37: 931-934.
- 8) Veurink G, Liu D, Taddei K, Perry Gm Smith MA, Robertson TA, Hone E, Groth DM, Atwood CS, Martins RN. Reduction of inclusion body in ApoE-deficient mice fed a combination of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1070-1077.
- 9) Lee J, Hwang KT, Lee JM, Kim SH, Watson RR, Park KY. Supplementation of French maritime pine bark extract prevents lung injury and lipid peroxidation in nude mice exposed to side-stream cigarette smoke. *J Food Sci Nutr* 2003; 9: 65-70.
- 10) Saeed H, Lee J, Watson RR. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 154-169.
- 11) Cheshier JE, Ardestani-Kaboudanian S, Liang B, Araghiniknam M, Chung S, Lane Lisa, Castro A, Watson RR. Immunomodulation by pycnogenol in retrovirus-infected or ethanol-fed mice. *Life Sci* 1996; 58: 87-96.
- 12) Huynh HT, Teel RW. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by pycnogenol. *Anticancer Res* 2000; 20: 2417-2420.
- 13) Huang WW, Yang JS, Lin CF, Ho WJ, Lee MR. Pycnogenol induces differentiation and apoptosis in human promyeloid leukemia HL-60 cells. *Leuk Res* 2005; 29: 685-692.
- 14) Wang J, Green PS, Simpkins JW. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2001; 77: 804-811.