레스베라트롤의 HT-29 대장암 세포증식 및 이동성 억제효과

이솔화, 박송이, 김인섭, 박옥진¹, 김영민*

Effects of Resveratrol on Migration and Proliferation in HT-29 Colon Cancer Cells

Sol Hwa Lee, Song Yi Park, In-Seop Kim, Ock Jin Park¹, and Young Min Kim*

접수: 2012년 7월 30일 / 게재승인: 2012년 10월 10일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Resveratrol, natural polyphenol in grapes and red wine, is known to have the anti-proliferatory and anti-angiogenic effects in various cancer cells. In this study, we have investigated the effects of resveratrol in HT-29 colon cancer cells. Treatment of resveratrol in different concentrations and time inhibited proliferation of HT-29 colon cancer cells. We explored the effects of resveratrol on HT-29 colon cancer cell motility using a wound healing assay. In the absence of the resveratrol, the HT-29 cells are migrated along the edges of the wound and showed a large-scale migration, whereas dose- and time-dependent inhibition of cell flattening and spreading was observed in the presence of resveratrol. Resveratrol inhibited MMP-9 in a dose- and time-dependent on HT-29 colon cancer cells by Western blotting. In addition, resveratrol increased AMPK activity and decreased COX-2, VASP and VEGF expression. Treatment of compound C inhibited AMPK activity, however, the expression of VASP and COX-2 increased thus, COX-2 and VASP are modulated by AMPK. However treatment of celecoxib could not control AMPK activity but decreased VEGF expression. We suggest that resveratrol inhibits cell proliferation and migration through activation of

AMPK and decreased COX-2, VASP and VEGF expression in HT-29 colon cancer cells.

Keywords: Resveratrol, COX-2, VASP, VEGF, angiogenesis

1. 서론

대장암은 서구 남녀 모두에게 높은 발병률을 갖고 있으며 외과적 수술로 치료할 수 있음에도 불구하고 50%의 생존을 갖는 악성종양 중의 하나로 수술 후 암 전이의 예방에 큰 관심이 집중되고 있다 [1]. 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관을 생성하는 혈관생성 (angiogenesis)은 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 하며, 혈관생성이 일어나는 원인은 혈관생성 인자들이 내피세포막의 특정수용체와 결합하여 세포의 이동과 세관 형성 (tube formation)이 일어나기 때문에 발생한다. 그러므로 이런 혈관생성을 유발하는 인자들의 작용 기작을 저해함으로써 전이를 억제하려는 많은 연구들이 현재 진행되고 있다 [2,3].

포도, 레드와인, 땅콩, 오디 등 다양한 식품에 함유되어 있는 레스베라트롤 (resveratrol)은 폴리페놀 (polyphenol)류의 한 종류로 항산화, 항염증 효과가 있으며, 동맥경화증으로부터 혈관을 보호하고 혈소판응집을 저해하는 효과를 갖는 것으로 알려져 있다 [4,5]. 또한 유방암, 대장암, 전립선암 등 여러 암세포의 증식을 억제함으로써 항암효과가 나타났고, *in vivo* 실험에서 레스베라트롤을 처리한 실험군의 종양 크기와 미세혈관 밀도가 감소한다고 보고되었다 [4]. 레스베라트롤은 basic fibroblast growth factor (bFGF)에 의해 자극된 섬유아세포 (fibroblast)에서 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)생성을 막아 혈관생성을 감소시

한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과
Department of Biological Sciences and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea
Tel: +82-42-629-8753, Fax: +82-42-629-8751
e-mail: kym@hnu.kr

¹한남대학교 생명나노과학대학 식품영양학과
¹Department of Food and Nutrition, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

키고 vascular endothelial growth factor (VEGF)에 의해 자극된 내피세포에서 nitric oxide (NO) 생성을 감소시킴으로써 혈관생성을 억제한다고 보고되었다 [3].

COX는 COX-1, COX-2의 2가지 isoform으로 존재하며, 그 중 COX-2는 PGE₂ 생성을 촉매하며 위암, 대장암 등 여러 암에서 과발현 되어있다고 보고되었다 [6]. COX-2는 여러 메커니즘을 통해 세포성장, 염증, 죽상동맥경화증, 조직 상처, 종양혈관생성 과정에서 중요한 역할을 한다 [7]. 대장암 세포에서 과발현되어 있는 COX-2는 VEGF 및 epidermal growth factor receptor (EGFR)와 같은 angiogenic factor의 합성에 관여하여 종양의 성장과 혈관생성에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 [2]. 또한 간암세포에서는 VEGF, Fms-like tyrosine kinase 1 (Flt-1), Flk-1/KDR, angiopoietin-1, tie-2, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), osteopontin (OPN)의 조절을 통해 혈관생성에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 [8]. 암 세포에서 과발현되어 있는 300 kDa protein (p300)은 다양한 염증유발인자를 통해 COX-2 전사를 활성화시켜 세포증식을 촉진하고 혈관생성을 유도하는 것으로 보고되었다 [7].

VEGF는 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, placenta growth factor (PIGF)와 같은 VEGF family로 구성되어 있으며, 널리 알려진 혈관생성 인자로서 종양 혈관생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 [9,10], IL-1, IL-6, transforming growth factor (TGF)- β 와 같은 성장인자와 여러 사이토카인에 의해 발현되어 혈관생성에 관여한다 [11].

Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)은 cAMP-및 cGMP-의존성 단백질 키나아제의 기질로 작용하며 혈관 내피세포와 혈소판에서 prostaglandins와 NO donor와 같은 혈관확장 인자에 의해 활성을 갖는다 [12]. VASP는 actin, profilin, vinculin 등의 단백질과 결합하여 세포의 이동을 조절하며 여러 암세포의 증식과 전이에 관여한다 [13]. 또한 VASP는 Ser-Thr 키나아제 역할을 하는 AMP-activated protein kinase (AMPK)에 의해 Thr-278 부위가 조절됨으로써 액틴-세포골격의 재배치가 일어나는 과정에 신호를 보내는 것으로 밝혀졌다 [14].

AMPK는 세포에서 에너지 센서 역할을 하며 활성화된 AMPK는 여러 암종에서 mammalian target of rapamycin (mTOR) 신호전달 과정을 저해함으로써 세포증식 억제와 apoptosis 유도를 촉진한다 [15]. 최근 연구에 metformin에 의한 AMPK 활성화는 난소암 성장을 저해하며, 이때 미세혈관 밀도와 VEGF 발현감소가 함께 일어남이 보고되었다 [16].

본 연구에서는 HT-29 대장암세포에 레스베라트롤을 처리했을 때, 첫째 암세포의 증식 억제와 세포 이동에 어떠한 영향을 미치는지 알아 보았고, 둘째 이러한 과정에서 활성화된 AMPK가 혈관 생성에 관여하는 COX-2, VASP 및 VEGF의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 실험에서 사용된 레스베라트롤은 Sigma (Sigma Aldrich,

St. Louis, MO)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 뒤 100 mM stock으로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma에서 구입하여 5 mg/mL stock으로 만들어서 사용하였다. 또한, celecoxib와 Compound C는 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입하여 DMSO에 녹인 뒤 각각 100 mM과 10 mM stock으로 만들어 사용하였다.

2.2. 세포 배양

HT-29 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% antibiotics (100 mg/L streptomycin, 100 U/mL penicillin)가 포함된 RPMI 1640 배지 (WelGENE Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양하였다. 매 48시간마다 Trypsin-EDTA (WelGENE Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 세포를 부유상태로 만든 다음 세포를 1×10^6 개/mL로 분주하고 계대하여 실험에 사용하였다.

2.3. MTT assay에 의한 암세포의 생존율 측정

세포배양용 12 well plate에 HT-29 세포를 1×10^5 개/mL로 분주하고 24시간 동안 배양시킨 후 레스베라트롤을 처리하였다. Celecoxib와 Compound C처리시에는 celecoxib와 Compound C를 30분 먼저 처리한 후 레스베라트롤을 처리하였다. 24시간 후 5 mg/mL 농도로 MTT 용액을 30 μ L씩 첨가하여 1시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. MTT 시약이 들어있는 배지를 제거한 후에 DMSO 150 μ L 넣어 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후, 96 well plate에 100 μ L씩 옮겨서 Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories, Inc. California, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번 하였으며, 그에 따르는 평균값과 표준오차는 Microsoft Excel program을 이용하여 분석하였다.

2.4. Wound healing assay에 의한 HT-29 cell migration 관찰

세포 배양용 6 well plate에 HT-29 세포를 1×10^5 개/mL로 분주하고 48시간 동안 배양시킨 후 12시간 동안 serum-free medium에 배양하였다. 플라스틱 200 μ L tip을 이용하여 단일 세포층을 scratch한 후 레스베라트롤을 농도별로 처리하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포이동성은 0, 24, 48시간마다 사진 촬영하여 관찰 하였다.

2.5. Western blotting

레스베라트롤을 농도 별로 처리하고 6시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후, 단백질을 추출하기 위하여 RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethanesulfonyl]를 각 well에 150 μ L씩 첨가하여 반응시킨 후, 14,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 그런 다음, ELISA-reader 595 nm에서 흡광도를 측정하여 각 표본의 단백질 농도를 결정하였다. 5x Laemmli sample buffer (loading dye; 250 mM Tris-Cl (pH 6.8), 40% glycerol, 4% β

-mercaptoethanol, 0.08% bromophenol blue, 8% SDS)와 HT-29 세포에서 추출한 단백질을 혼합하여 표본을 제작한 후, p-AMPK, COX-2, VASP, VEGF, β -actin의 1차 항체를 밤새 4°C에서 반응시키고 2차 항체를 결합시킨 후 실험 결과를 측정하였다.

2.6. 통계처리

통계 프로그램인 SPSS 17.0을 사용하여 실험설계에 대한 분산분석은 ANOVA로, 각 처리군들과의 비교는 일원배치 분산분석을 실시하여 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 레스베라트롤이 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향

기존의 혈관으로부터 새로운 혈관을 생성하는 혈관생성은 여러 성장인자들에 의해 발생하며 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 한다. 그러므로 이러한 혈관생성을 유발하는 인자들의 작용 기작을 저해함으로써 전이를 억제하려는 많은 연구들이 진행되고 있다 [2,3]. 레스베라트롤은 암과 혈관질환을 예방하는 파이토케미컬로서 유방암, 대장암 등 여러 암 세포의 증식을 억제하고 미세혈관 밀도를 감소한다고 보고됨에 따라 본 연구에서는 HT-29 세포에 레스베라트롤을 처리

Fig. 1. Resveratrol inhibits cell proliferation in HT-29 colon cancer cells. Cell viability was measured by MTT assay. Cells were treated with 50~200 μ M of resveratrol 24 h (a). Cells were treated with resveratrol 100 μ M for 6~24 h (b) $^{a-d}P < 0.05$ (each experiment's $n = 3$).

했을 때 세포증식 억제 및 세포 이동성 저해효과를 관찰하고자 하였다. 먼저 레스베라트롤이 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 레스베라트롤을 농도 및 시간별로 처리하여 MTT assay를 통해 암세포의 세포 증식률을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1(a)에서와 같이 레스베라트롤을 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M의 농도로, 24시간 처리했을 때 50 μ M에서는 약 90%, 100 μ M에서는 약 70%, 그리고 200 μ M에서는 약 50%로 대조군에 대비하여 세포수가 억제되었음을 나타냈으며, 농도가 높아짐에 따라 세포의 증식이 억제되는 것을 관찰하였다. 또한 Fig. 1(b)에서와 같이 레스베라트롤 100 μ M을 시간별로 처리하였을 때 6시간 후에는 약 90%, 12시간 후에는 약 80%, 그리고 24시간 후에는 약 60%의 증식률을 나타내어 시간이 지남에 따라 대조군과 비교했을 때 세포의 증식이 억제됨을 확인하였다. 따라서 HT-29 세포의 증식억제에 있어서 레스베라트롤이 효과적으로 작용함을 알 수 있었다.

3.2. 레스베라트롤이 HT-29 세포의 이동성에 미치는 영향

레스베라트롤은 대장암에서 caspase-3의 활성화와 핵분열을 증가시켜 apoptosis를 유도하고 신경교종 세포에서 apoptosis를 유도하는 것으로 밝혀졌다 [17,6]. 이러한 선행연구를 통해 레스베라트롤이 apoptosis에 효과적임을 확인하였다. 따라서 이러한 효과가 세포의 이동성에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 wound healing assay를 실시하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 레스베라트롤을 100 μ M, 200 μ M으로 처리하여 24시간과 48시간에 세포의 이동성을 측정하였을 때 농도와 시간에 의존적으로 세포의 이동성이 저해되는 것을 확인하였다. 최근 연구에서 신경교종 세포 *in vivo*에서 CD31을 이용한 immunohistochemical staining을 통해 레스베라트롤을 처리한 실험군이 대조군과 비교했을 때 종양의 미세혈관밀도가 감소하는 것으로 나타났다 [6]. 이러한 선행연구와 본 연구를 통해 레스베라트롤이 암세포의 전이 억제에 효과가 있음을 확인 하였다.

Fig. 2. Resveratrol inhibits cell migration in HT-29 colon cancer cells. Cell migration was measured by wound migration assay. Cells were treated with 100~200 μ M of resveratrol for 24~48 h.

3.3. 레스베라트롤이 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 활성화에 미치는 영향

세포의 기저막을 분해하는 MMP-9은 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 의해 조절되며 tissue inhibitor of metalloproteinase-1

(TIMP-1)과의 결합을 통해 암세포의 침윤과 전이를 조절하는 효소로 알려져 있다 [18]. 따라서 레스베라트롤이 전이에 중요한 역할을 하는 MMP-9의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 3(a)에서와 같이 레스베라트롤을 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M으로 처리했을 때 농도 의존적으로 MMP-9 효소 활성이 저해되는 것을 관찰하였다. 또한 레스베라트롤 100 μ M을 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h 처리하였을 때 Fig. 3(b)에서 나타난 바와 같이 시간에 의존적으로 MMP-9 효소 활성이 저해되는 것을 확인하였다.

Fig. 3. Resveratrol modulates on MMP-9 in HT-29 colon cancer cells. The level of MMP-9 was measured by Western blotting. Cells were treated with the different concentrations 50~200 μ M for 6 h (a). Cells were treated with resveratrol 100 μ M for 0.5~6 h (b).

3.4. 레스베라트롤이 p-AMPK, COX-2, VASP 및 VEGF 발현에 미치는 효과

레스베라트롤의 세포증식억제 및 전이억제 효과에 있어서 암세포의 증식에 관여하는 분자인 p-AMPK, COX-2, VASP, VEGF의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 4(a)에 나타난 바와 같이 레스베라트롤을 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M으로 6시간 처리했을 때, 농도가 증가함에 따라 p-AMPK의 활성이 증가한 반면, 레스베라트롤의 농도가 높아질수록 COX-2, VASP, VEGF의 발현은 점차 감소됨을 확인하였다. 또한, 레스베라트롤을 100 μ M을 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h 처리한 결과 Fig. 4(b)에서와 같이 시간이 지남에 따라 p-AMPK의 활성이 증가하였지만, 시간이 지남에 따라 COX-2, VASP, VEGF의 발현은 점차 감소됨을 확인하였다. 최근 연구에서 난소암의 *in vivo* 실험에서 metformin에 의한 AMPK 활성화는 mTOR 및 p21, p27, cyclin D1의 발현을 조절함으로써 세포의 증식을 억제하고 미세혈관밀도를 감소시켜 혈관형성을 저해하는 것으로 보고되었다 [16]. 또한 레스베라트롤은 신경교종 세포에서 VEGF의 발현을 저해함으로써 혈관신생을 억제하여 종양 성장을 저해하였으며 [6], 난소암에서는 HIF-1 α 과 VEGF의 발현을 저해함으로써 혈관신생을 억제하는 것으로 보고되었다 [3]. VASP는 세포의 이동성을 조절하며 여러 암세포의 증식과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 최근 연구를 통해 VASP 유전자가 결핍된 VASP^{-/-} mouse와

wild type mouse에 B16F10세포를 피하 주사한 뒤 종양의 성장속도를 비교 한 결과, VASP^{-/-} mouse의 종양성장이 wild type mouse에 비해 더 느린 것으로 나타나 전이과정에 중요 조절인자임이 확인되었다 [19]. 따라서 Fig. 3의 결과와 선행 연구들을 종합해 본다면 p-AMPK, COX-2, VASP 및 VEGF는 암세포의 증식과 전이에 중요한 분자이며, 레스베라트롤은 농도가 높아짐에 따라 p-AMPK 활성이 증가하고 COX-2, VASP, VEGF의 발현 감소를 통하여 암세포의 증식과 전이를 억제한다고 할 수 있다.

Fig. 4. Resveratrol modulates on AMPK, COX-2, VASP, and VEGF in HT-29 colon cancer cells. Protein level was measured by Western blotting. Cells were treated with the different concentrations 50~200 μ M for 6 h (a). Cells were treated with resveratrol 100 μ M for 0.5~6 h (b).

3.5. AMPK, COX-2 저해제 처리가 p-AMPK, COX-2, VASP 및 VEGF 신호경로에 미치는 영향

AMPK의 저해제인 Compound C와 COX-2의 저해제인 celecoxib를 HT-29 세포에 각각 처리했을 때 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 Compound C 10 μ M를 처리했을 때 세포의 증식률이 약 110%로 나타났다. 레스베라트롤을 단독으로 처리했을 때 약 80%의 세포 생존율을 보였지만, Compound C와 레스베라트롤을 함께 처리했을 때에는 세포의 증식률이 약 95%가 되었다. 이는 AMPK의 저해제에 의해 레스베라트롤이 조절하는 HT-29 세포의 세포증식 억제 효과가 저해된 것으로 보인다. 이를 통하여 레스베라트롤의 세포증식억제에 효과에 있어서 AMPK가 중요한 신호 분자로서 작용함을 확인할 수 있다. Celecoxib 50 μ M을

처리했을 때에는 세포 증식률이 약 70%로 나타났으며, 레스베라트롤과 함께 처리했을 때에는 세포증식률이 약 60%로 감소되었다. 이와 같이 COX-2를 저해했을 때 레스베라트롤에 의한 암세포의 증식억제효과가 더욱 강하게 나타나며 COX-2가 세포증식에 중요한자임을 나타낸다. 동일한 조건에서 레스베라트롤이 p-AMPK, COX-2, VASP, VEGF 신호 분자 조절에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. 그 결과, Fig. 6에서 보이는 바와 같이 Compound C를 단독으로 처리했을 때 p-AMPK의 활성이 저해되었으나 COX-2, VASP 발현은 증가하였다. Compound C와 레스베라트롤 병행처리시 COX-2의 발현은 레스베라트롤에 의해 감소하였지만 Compound C의 영향으로 레스베라트롤만 처리했을 때와 비교하여 발현양이 증가한 것으로 보인다. VASP 또한 마찬가지로 Compound C와 레스베라트롤을 병행처리했을 때 Compound C의 영향으로 레스베라트롤만 처리했을 때와 비교하여 발현양이 증가한 것으로 보인다. 이러한 결과로 보아 레스베라트롤에 의한 COX-2와 VASP 신호분자의 조절은 AMPK 의존적인 경로를 통해 더 강하게 저해될 수 있다는 것을 확인하였다. 한편 celecoxib를 단독으로 처리했을 때 COX-2와 VEGF의 발현이 감소하였으며 AMPK와 VASP활성은 변함이 없었다. 이는 COX-2가 VEGF를 직접적으로 조절하는 조절인자로 작용할 수 있음을 의미한다. 또한 레스베라트롤에 의해 활성화된 AMPK는 COX-2와 VASP 신호분자의 발현을 저해하는 것으로 나타났으며, COX-2의 발현조절이 VEGF의 발현에 영향을 미칠 수 있는 것으로 확인되었다. 그러나 레스베라트롤을 처리하였을 때 VEGF의 발현조절은 AMPK/COX-2에 비의존적인 경로로 일어날 수 있는 것으로 보인다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 레스베라트롤이 HT-29 세포의 증식억제와 이동성을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또한 레스베라트롤은 기저막 분해효소인 MMP-9의 활성을 저해하며 이러한 세포증식 억제 및 이동성 억제효과는 AMPK, COX-2, VASP, VEGF 신호분자를 경유하여 일어나는 것으로 보인다.

Fig. 5. Treatment of resveratrol, Compound C and celecoxib. One hundred μM resveratrol was treated with 10 μM of Compound C or 50 μM of celecoxib. HT-29 colon cancer cells were pre-treated with 10 μM of Compound C or 50 μM of celecoxib. Cell viability was measured by MTT assay. ^{a-d}P < 0.05 (each experiment's n = 3).

Fig. 6. Compound C and celecoxib effect of p-AMPK, COX-2, VASP, and VEGF pathway in HT-29 colon cancer cells. One hundred μM resveratrol was treated with 10 μM of Compound C or 50 μM of celecoxib. HT-29 colon cancer cells were pre-treated with 10 μM of Compound C or 50 μM of celecoxib. Protein levels of p-AMPK, COX-2, VASP, and VEGF were detected by Western blotting.

4. 결론

레스베라트롤은 레드와인에 다량 함유되어 있으며 여러 신호경로를 통하여 많은 암종의 증식과 혈관신생 억제 효과가 있다고 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 HT-29 세포에 레스베라트롤을 처리했을 때 HT-29 세포의 증식과 이동성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. MTT assay를 통한 세포생존율 측정에서 레스베라트롤을 농도별과 시간별로 처리하였을 때 HT-29 세포의 증식이 억제되었다. Wound healing assay를 통한 이동성 실험에서 레스베라트롤의 농도 및 시간에 의존적으로 세포의 이동성이 감소됨을 확인하였다. 세포의 기저막을 분해하는 MMP-9 활성화에 레스베라트롤이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blotting을 실시한 결과 농도 및 시간 의존적으로 MMP-9 활성이 감소함을 확인하였다. 또한 p-AMPK 활성이 증가하였고, COX-2, VASP, VEGF 발현이 감소함을 확인하였다. AMPK 저해제인 Compound C를 처리했을 때 p-AMPK 활성이 저해되고 COX-2와 VASP 발현이 증가함을 확인하였다. 한편 celecoxib를 단독으로 처리했을 때 COX-2와 VEGF의 발현이 감소하였으며 AMPK와 VASP활성에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 본 연구를 통하여 레스베라트롤이 HT-29 세포의 증식억제와 이동성을 억제하며 이러한 억제효과는 AMPK, COX-2, VASP 및 VEGF 신호분자를 경유하여 일어나는 것임을 확인하였다.

감사

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술재단의 전략기술양성사업 및 2012년 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2012-0021402).

References

1. Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer. J. Clin.* 30: 277-300.
2. Hieken, T. J., M. Farolan, S. D'Alessandro, and J. M. Velasco (2001) Predicting the biologic behavior of ductal carcinoma in situ: an analysis of molecular markers. *Surgery* 130: 593-600.
3. Uchiyama, T., K. Toda, and S. Takahashi (2010) Resveratrol inhibits angiogenic response of cultured endothelial F-2 cells to vascular endothelial growth factor, but not to basic fibroblast growth factor. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1095-1100.
4. Tseng, S. H., S. M. Lin, J. C. Chen, Y. H. Su, H. Y. Huang, C. K. Chen, P. Y. Lin, and Y. Chen (2004) Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin. Cancer Res.* 10: 2190-2202.
5. Belguendouz, L., L. Fremont, and A. Linard (1997) Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 53: 1347-1355.
6. Han, Y. D., Y. K. Hong, J. G. Kang, Y. J. Choi, and C. H. Park (2010) Relation of the expression of cyclooxygenase-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas to angiogenesis and prognosis. *J. Korean Soc. Coloproctol.* 26: 339-346.
7. Xiao, X., D. Shi, L. Liu, J. Wang, X. Xie, T. Kang, and W. Deng (2011) Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PLoS One* 6: e22934.
8. Yao, L., F. Liu, L. Hong, L. Sun, S. Liang, K. Wu, and D. Fan (2011) The function and mechanism of COX-2 in angiogenesis of gastric cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* doi: 10.1186/1756-9966-30-13.
9. Kim, H. N., H. Kim, J. M. Kong, S. Bae, Y. S. Kim, N. Lee, B. J. Cho, S. K. Lee, H. R. Kim, Y. I. Hwang, J. S. Kang, and W. J. Lee (2011) Vitamin C down-regulates VEGF production in B16F10 murine melanoma cells via the suppression of p42/44 MAPK activation. *J. Cell Biochem.* 112: 894-901.
10. Binion, D. G., M. F. Otterson, and P. Rafiee (2008) Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 57: 1509-1517.
11. N. Konishi, C. Miki, T. Yoshida, K. Tanaka, Y. Toiyama, and M. Kusunoki (2005) Interleukin-1 receptor antagonist inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Oncology* 68: 138-145.
12. Price, C. J. and N. P. Brindle (2000) Vasodilator-stimulated phosphoprotein is involved in stress-fiber and membrane ruffle formation in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2051-2056.
13. Reinhard, M., K. Jouvenal, D. Tripiet, and U. Walter (1995) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* 92: 7956-7960.
14. Blume, C., P. M. Benz, U. Walter, J. Ha, B. E. Kemp, and T. Renné (2007) AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 282: 4601-4612.
15. Hwang, J. T., Y. M. Kim, Y. J. Surh, H. W. Baik, S. K. Lee, J. Ha, and O. J. Park (2006) Selenium regulates cyclooxygenase-2 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways by activating AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. *Cancer Res.* 66: 10057-10063.
16. Rattan, R., R. P. Graham, J. L. Maguire, S. Giri, and V. Shridhar (2011) Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity *in vivo*. *Neoplasia* 13: 483-491.
17. Juan, M. E., U. Wenzel, H. Daniel, and J. M. Planas (2008) Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4813-4818.
18. Zhao, Q., Z. D. Liu, Y. Xue, J. F. Wang, H. Li, Q. J. Tang, Y. M. Wang, P. Dong, and C. H. Xue (2011) Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 12: 534-544.
19. Kim, Y. M., C. Renné, S. Seifert, K. Schuh, and T. Renné (2011) Impaired melanoma growth in VASP deficient mice. *FEBS Lett.* 585: 2533-2536.