

## HCT116 대장암 세포주에서 Butyrate에 의한 Survivin 발현 변화

단국대학교 의과대학 외과학교실

박동국

### The Changes of Expression of Survivin by Butyrate in HCT116 Colon Cancer Cells

Dong-Guk Park, M.D.

Department of Surgery, School of Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea

**Purpose:** The causes of colon cancer can be divided into genetic and environmental components. A high-fiber diet is known to reduce the risk of colon cancer. Dietary fiber is converted to short chain fatty acid, butyrate, in the colon by bacteria. Butyrate is used as an energy source for the colonic epithelial cells, and is known to induce apoptosis in colon cancer cell lines. Survivin, a recently discovered member of the IAP (inhibitor of apoptosis) family, is known to suppress apoptosis. Not only does it suppress cell apoptosis, but it also has a protective effect from disabling G2/M phase of the cell cycle by attaching to the microtubule of the mitotic spindle. The purpose of this study is to evaluate the effect of butyrate on the expression of survivin, in HCT116 colon cancer cell lines.

**Methods:** Cytotoxicity of butyrate was measured by MTS method. Cell cycle phase and apoptosis was analyzed by flowcytometry. Protein expression of survivin was evaluated by Western blot analysis, and the mRNA expression by RT-PCR.

**Results:** Butyrate can induce apoptosis in HCT116 colon cancer cell line at a concentration of 6 mM. Butyrate suppressed the expression of survivin mRNA and also the expression of cytosolic and nuclear survivin. In flowcytometric analysis, the apoptotic portion was increased and the proportions of S and M phase were decreased when cultured with butyrate.

**Conclusion:** We concluded that butyrate could induce cellular apoptosis partially by suppressing the expression of survivin in HCT116 colon cancer cells. (J Korean Surg Soc 2009;77:297-305)

**Key Words:** Butyrate, Survivin, Colon cancer, Apoptosis

중심 단어: Butyrate, Survivin, 대장암, 세포사멸

## 서 론

대장암의 발생 원인에는 유전적 요인과 환경적 요인이

있다. 특히 환경적 요인 중에 가장 중요한 것은 우리가 매일 섭취하는 음식의 변화에 있다. 소화기관은 외부로부터 음식 섭취에 따른 여러 가지 독성 물질들이나 발암 물질들에 의하여 끊임없이 노출되어 손상을 받고 있다. 또한 대장의 점막 상피 세포는 crypt의 stem cell에서 분화하여 일주일이면 상피세포의 사멸에 의하여 대장내로 탈락되는 과정이 반복됨으로써 손상 받는 상피 세포들이 계속 증식하는 것을 억제할 수 있다. 그러나 손상 받은 일부 상피 세포들이 세포 사멸 기전의 영향에서 벗어나 계속 증식을 하게 되면 이로 인한 과증식에 의해 종양이 발생하게 된다.

책임저자: 박동국, 충남 천안시 동남구 안서동 산 16-5  
☎ 330-715, 단국대학교 의과대학 외과학교실  
Tel: 041-550-3931, Fax: 041-565-6167  
E-mail: dkpark@dankook.ac.kr

접수일: 2009년 7월 1일, 게재승인일: 2009년 8월 13일  
본 논문은 2004년 단국대학교의료원 의학연구소의 연구비 지원으로 연구되었음.

고지방 식이의 섭취에 의하여 증가된 이차 담즙산 중 특히 deoxycholic acid가 대장 상피 세포에 손상을 주어 이로 인하여 대장암의 발생을 촉진한다. 반대로 섬유소의 섭취를 많이 하면 대장암의 발생을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 섭취한 섬유소는 대장에서 발효되어 단쇄 지방산인 butyrate를 생성하며 이 butyrate는 대장의 상피 세포의 에너지 원으로 사용된다. 또한 butyrate는 대장 용종 세포주인 AA/C1 세포주와 대장암 세포주에서 p53과 무관한 방법으로 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다.(1) Butyrate의 세포 사멸효과는 Fas 발현이나 Bcl-2 family 단백질의 발현과는 관계가 없다고 알려져 있으나,(2,3) protein kinase C (PKC)와 p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase)를 활성화시켜 세포 사멸을 유도한다. 이는 담즙산의 영향과는 반대이며 담즙산이 있으면 세포 사멸을 유도하는 영향이 감소한다.(4)

Survivin은 최근에 발견된 IAP (inhibitor of apoptosis) family의 하나로 16 kD의 크기를 가지는 단백질이며 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. 정상 성인의 조직에서는 발현하지 않고 폐, 대장, 유방, 췌장 등 장기의 암 조직에 발현하는 것으로 알려져 있다.

본 연구의 목적은 식이중의 섬유소가 발효되어 생성되는 butyrate가 대장암 세포주의 세포 사멸에 미치는 영향과 세포 사멸의 억제 물질인 survivin의 발현에 미치는 영향을 연구하는 것이다

## 방 법

### 1) 재료

본 실험에 사용한 항체는 Bcl-2 (100, R&D, Minnesota, MN, USA), Bax (R&D), survivin (R&D) 등이다. 세포 배양에 사용한 배지로는 RPMI1640 (JEIL Biotech Services Incorp, Daegu, Korea)을 사용했으며 첨가한 시약들은 우태아혈청 (FBS, Hyclone Laboratories, Logaer, UT, USA), penicillin-streptomycin, butyrate (Sigma, St Louis, MO, USA) 등이며 세포독성 검사를 위한 MTS방법에 사용한 시약들은 MTS (3,-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, Promega, Madison Wisconsin), PMS (phenazine methosulfate, Promega) 등이다. 그 외 시약들은 모두 Sigma Biochemical에서 구입하였다.

### 2) HCT116 대장암 세포주 배양

HCT116 대장암 세포주는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 3번 계대 배양한 후 HCT116 대장암 세포주를  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 의 세포 농도로 60 mm 크기의 배양용기(Falcon)에 배양하였으며 3일마다 배양액의 반을 갈아주었다. 세포독성 검사를 위하여는 96 well 배양용기(Falcon)를 사용하였다. 배양액은 RPMI1640에 penicillin-streptomycin (100 U/ml)을 첨가하였고 10%의 우태아혈청을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 가습 상태의 세포배양기(Forma, USA)에서 배양하였다. 모든 실험 시 HCT116 세포를 분주한 후 혈청을 첨가하지 않은 RPMI1640 배양액으로 48시간 배양하여 G1기에 동기화를 시행하였으며 이는 유세포분석기로 확인하였다.

### 3) MTS 방법에 의한 butyrate의 세포 독성 측정

각 농도의 butyrate에 대한 세포 독성을 알기 위하여, HCT116 대장암 세포를  $1 \times 10^3$  cells/well이 되도록 RPMI1640 배양액으로 희석하여 세포 현탁액을 96 well 배양용기(Falcon)의 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 24시간 동안 배양하여 세포를 배양용기에 부착시켰다. 배지를 1, 2, 4, 8, 16, 32 mM 농도의 butyrate가 들어있는 배양액으로 갈아주고 72시간 동안 배양한 후 세포독성을 MTS 방법으로 측정하였다. 각 농도의 butyrate가 들어있는 배양액은 매일 새로운 배양액으로 갈아주었다. MTS 방법은 2.0 ml의 MTS (3,-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, Promega) 용액과 100  $\mu$ l의 PMS (phenazine methosulfate, Promega) 용액을 혼합하고 각 well에 MTS/PMS 용액을 20  $\mu$ l씩 넣어서 가습된 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후 precision microplate reader (Molecular Devices)로 490/650 nm에서 반응 생성물인 formazan의 흡광도를 측정하여 각 농도에 따른 독성을 성장 억제율(%)로 표현하였다.

### 4) 유세포분석기를 이용한 세포주기 및 세포사멸 측정

Butyrate의 농도를 6 mM로 72시간 동안 배양한 후 butyrate에 의한 세포주기의 변화와 세포 사멸의 변화를 측정하기 위하여 배양액을 제거하였다. 세포들을 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 배양용기로부터 세포들을 모아 세포를 70% 에탄올로 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 100 $\times$  g로 2분 동안 원심분리를 한 후 세포들을 다시 150  $\mu$ g/ml의 RNase가 포함된 에탄올에 넣어 실온에서 반응시

킨다. 다시 세포들을 원심 분리하여 세포들을 모으고 다시 PBS로 세포 현탁액을 만든다. Propidium iodide ( $10 \mu\text{g/ml}$ )는 flowcytometry를 시행하기 30분 전에 첨가하며 flowcytometry는 FACS (Beckon-Dickon, USA)을 사용하여 측정하였다. Forward scatter와 side scatter와 PI에 대한 red fluorescence를 620 nm에서 얻어 세포주기의 변화와 세포사멸의 정도를 측정하였다.

##### 5) 단백 발현 측정

배양액에 6 mM의 butyrate를 첨가하여 HCT116 대장암 세포주를 72시간 동안 배양한 후 이 세포들을 얼음으로 차갑게 한 0.1 M PBS ( $8.5 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $3 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $125 \text{ mM NaCl}$ )로 3차례 세척한 후 세포들을 세포 용해 완충액( $25 \text{ mM Tris-Cl}$  (pH 7.0),  $1 \text{ mM EDTA}$ ,  $1 \text{ mM PMSF}$ ,  $1 \text{ mg/ml}$  leupeptin, antipain, aprotinin  $0.1\%$  NP-40,  $250 \text{ mM NaCl}$ ,  $5 \text{ mM DTT}$ ,  $0.1\%$  Triton-X-100)에 용해시켰다. 세포 균질액을  $12,000 \text{ rpm}$ 으로 15분간  $4^\circ\text{C}$ 에서 원심분리를 시행하여 상층액을 취하여 세포질내의 단백질로 사용하였다. 아래 세포 침전물을 다시 Triton-X-100이 포함된 세포 용해 용액으로 다시 용해시켜  $12,000 \text{ rpm}$ 으로 15분간  $40^\circ\text{C}$ 에서 원심분리를 시행하여 상층액을 취하여 핵내 단백질의 분석에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford micro assay방법으로 측정하였으며 사용할 때까지 영하  $80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

세포 균질액  $30 \mu\text{g}$ 씩을 Laemmli sample buffer ( $0.5 \text{ M Tris-HCl}$  pH 6.8,  $10\%$  glycerol,  $2\%$  (w/v) SDS,  $5\%$  (v/v) 2- $\beta$ -mercaptoethanol and  $0.05\%$  bromophenollue)에 넣고  $95 \sim 100^\circ\text{C}$ 에서 5분간 가열한 후 각 시료를  $10\%$  polyacrylamide gels에서 Laemmli 방법에 의해 전기영동을 시행하였다. 분리된 단백질들을 nitrocellulose 막(BioRad, Hercules, CA)에 semi-dry transblot apparatus (BioRad)를 이용하여 이동시킨 후 막을  $1\%$  TBS with  $0.1\%$  Tween-20 buffer ( $\text{Tris } 50 \text{ mM}$ ,  $250 \text{ mM NaCl}$ ,  $0.1\%$  Tween-20, pH 7.5)에 녹인  $5\%$  non-fat skim milk로  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 반응시켰다. 특히 항체를 1 : 1,000의 배율로  $1\%$  TBS with  $0.1\%$  Tween-20 (TBS-T) 완충 용액에 희석하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 반응시켰다.  $1\%$  TBS-T로 10분씩 3번 세척한 후 peroxidase-conjugated 이차 항체(anti-mouse for monoclonal antibody, anti-goat for polyclonal antibody, 1 : 2,500 희석, Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시  $1\%$  TBS-T로 10분씩 3번 세척한 후 반응된 단백을 chemiluminescence kit (ECL kit, Amersham Corp.)로 반응시킨 후 image

analyser (LAS-2000, Fuji, Japan)로 단백발현을 검출하였다.

##### 6) RT-PCR로 mRNA 양 변화 측정

Butyrate 처리 후 세포 사멸에 관여하는 유전자가 전사과정에서 증폭되는지 여부를 알아보기 위하여 6 mM 농도의 butyrate를 첨가하여 72시간 동안 배양한 후 Trizol reagent (Life Technology)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 먼저 세포를 차가운 Trizol solution 1 ml에 넣어 세포를 균질화시킨 후 용액에 완전히 용해되지 않은 찌꺼기들을 제거하기 위하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 10분간  $12,000 \times \text{g}$ 로 원심분리를 시행하고 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후 5분간 실온에서 반응시키고 chloroform  $200 \mu\text{l}$ 를 넣고 15초 정도 심하게 vortexing한 후 실온에서 3분간 방치한 후에  $4^\circ\text{C}$ 에서 15분간  $12,000 \times \text{g}$ 로 원심 분리를 시행하였다. 조심스럽게 RNA가 포함된 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후 여기에 isopropyl alcohol  $500 \mu\text{l}$ 를 넣고 실온에서 10분간 반응시키고  $4^\circ\text{C}$ 에서 10분간  $12,000 \times \text{g}$ 로 원심 분리를 시행하였다. 상층액을 제거하여 RNA pellet이 생긴 걸 확인 한 후에  $75\%$ 의 에탄올 1 ml로 세척한 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 5분간  $7,500 \times \text{g}$ 로 원심 분리하여 에탄올을 제거하고 15분 동안 공기 중에서 건조시켜 RNA 침전물을 얻었다. 이것을 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수로 용해시킨 후 분광광도계로 OD  $260/280 \text{ nm}$ 에서 흡광도 측정하여 추출된 RNA의 농도를 측정하였다. 측정된 RNA는 영하  $80^\circ\text{C}$ 로 보관하고, 한 달 이내에 실험하였다. 각 RT-PCR에 사용한 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

## 결 과

##### 1) Butyrate 농도 결정

Butyrate를 1, 2, 4, 8, 16, 32 mM의 농도로 배양용액에 희석

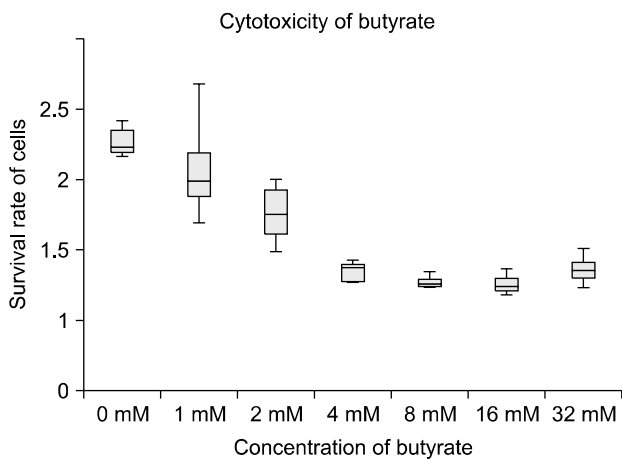
Table 1. Primers used for RT-PCR

Primer	
Survivin	5' CAC-CGC-ATC-TCT-ACA-TTC-AA 3' 3' CAC-TTT-CTT-CGC-AGT-TTC-CT 5'
Bcl-2	5' TCT-GCG-AAG-AAC-CTT-GTG-TG 3' 3' CTC-CAC-CAG-TGT-TCC-CAT-CT 5'
Bax	5' TTT-GCT-TCA-GGG-TTT-CAT-CC 3' 3' CGT-CCC-AAA-GTA-GGA-GAG-GA 5'
$\beta$ -actin	5' TCA-CCC-ACA-CTG-TGC-CCA-TCT-A 3' 3' CTA-GAA-GCA-TTT-GCG-GTG-GAC-G 5'

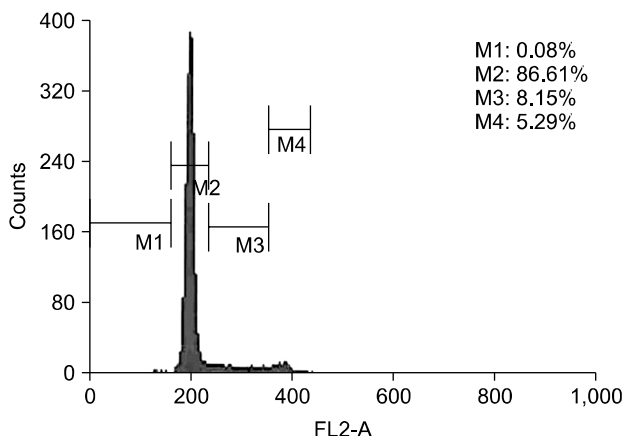
하여 HCT116 대장암 세포를 72시간 동안 배양하였다. Butyrate를 첨가하지 않은 대조군에 비해 butyrate를 첨가하였을 때 농도가 증가함에 따라 세포 독성이 증가하여 8~16 mM의 농도 사이에서 최대한의 세포 독성을 나타내었다. 그러나 32 mM의 butyrate 농도에서는 도리어 16 mM의 농도의 경우보다 세포 독성이 감소함을 보였다(Fig. 1). 본 실험에서는 8~16 mM의 농도의 butyrate에서는 세포 독성이 강하여 실험농도를 6 mM로 정하여 실험을 진행하였다.

## 2) HCT116 대장암 세포의 G1/S기 동기화

HCT116 세포주는 세포 분열이 아주 활발한 세포주로 실험



**Fig. 1.** Cytotoxicity to HCT116 colon cancer cell by butyrate. HCT116 cells were incubated with different concentrations of butyrate for 72 hours. Cytotoxicity was measured by MTS method.



**Fig. 2.** G1/S phase synchronization was induced by serum withdrawal for 3 days. The cell cycle phases were evaluated by flowcytometry. M1 = subG1 phase; M2 = G0/G1 phase; M3 = S phase fraction; M4 = M phase.

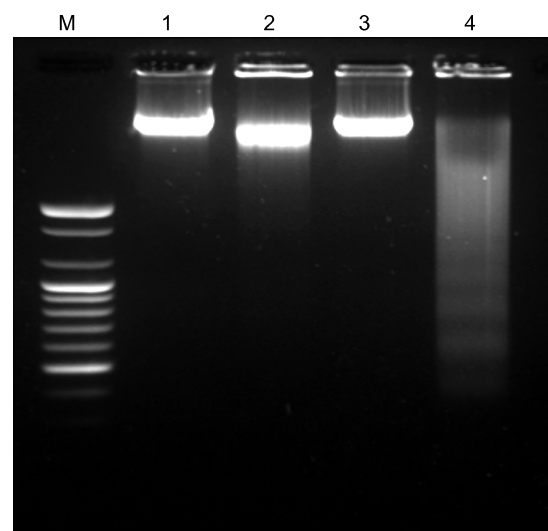
험을 할 때 세포주기의 각 기에 따른 세포들의 비율이 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다. HCT116세포들을 G1/S기에 동기화시키기 위하여 모든 실험을 진행하기 전 배양용기에 분주한 후 혈청이 없는 배양용액으로 48시간 동안 배양하였다. 이때의 세포 주기의 각 주기의 비율을 유세포분석기로 측정하였다. 유세포 분석 결과 G0/G1기의 세포의 비율이 약 87%를 차지하여 대부분의 세포들이 G1/S기에 동기화된 것을 확인하였다(Fig. 2).

## 3) Butyrate에 의한 HCT116 대장암 세포의 사멸

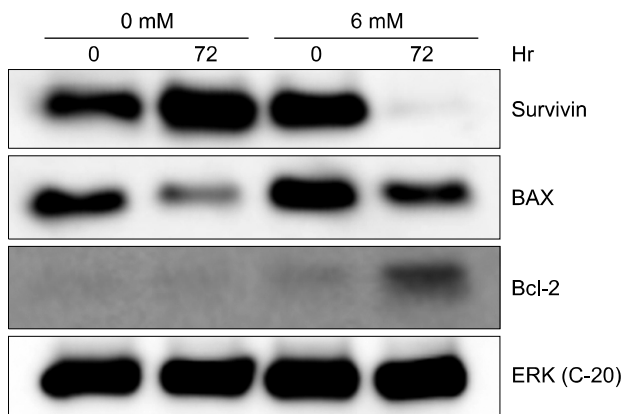
Butyrate를 HCT116 대장암 세포주에 처리하였을 때 세포 사멸이 유발되는지 알기 위하여 HCT116세포에 butyrate를 첨가하지 않은 군과 첨가하여 72시간 동안 배양한 군에서 DNA 분절화가 일어나는지를 실험하였다. Butyrate를 첨가하지 않고 72시간 동안 배양한 군에서는 세포 사멸의 결과인 DNA 분절화에 의한 DNA 사다리 모양이 나타나지 않으나 butyrate를 첨가하여 72시간 동안 배양한 군에서는 DNA 분절화가 일어나 butyrate에 의한 세포 독성은 세포 사멸에 의한 기전에 의하여 일어난다는 것을 확인하였다(Fig. 3).

## 4) Butyrate에 의한 세포사멸에 관여하는 단백질 발현 변화

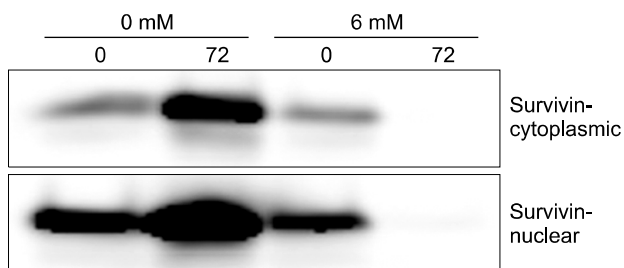
Butyrate를 첨가하여 72시간 동안 배양한 후에 세포 사멸



**Fig. 3.** DNA fragmentation by butyrate. The HCT116 cells were treated with or without butyrate. DNA fragmentation was induced only in 6 mM butyrate treated cells, which indicates cellular apoptosis. M = DNA marker; 1 = without butyrate, 0 hr; 2 = without butyrate, 72 hr; 3 = with 6 mM butyrate, 0 hr; 4 = with 6 mM butyrate, 72 hr incubation.

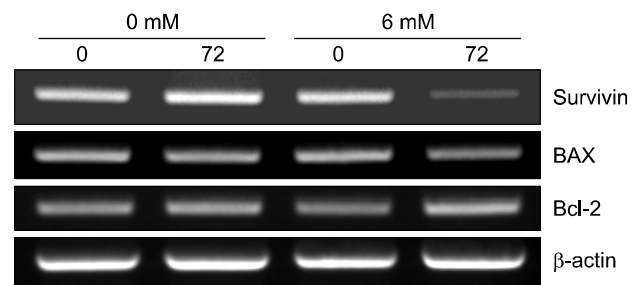


**Fig. 4.** Expression of survivin, Bcl-2, and Bax proteins. HCT116 cells were incubated with 6 mM butyrate for 72 hr. The expression of survivin, Bcl-2, and Bax protein was evaluated by Western blotting. Immunoblot analysis revealed that survivin completely lost its expression by butyrate, but on the contrary, Bcl-2 expression was increased by butyrate.



**Fig. 5.** Expression of cytoplasmic and nuclear survivin protein after 72 hour incubation with or without butyrate (6 mM). Butyrate can inhibit both cytoplasmic and nuclear survivin expression.

에 관여하는 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 측정하였다. 단백질 양의 정량을 위하여는 Erk1/2 단백을 이용하였다. 실험 결과 butyrate를 첨가하지 않고 72시간 배양하였을 때 세포 사멸의 억제제로 작용하는 survivin의 발현이 증가하였다. 그러나 butyrate를 첨가하여 배양한 경우에는 survivin 단백질이 발현 되지 않았다(Fig. 4). Survivin 단백질의 발현은 세포질에서뿐 아니라 핵 내에서도 발현이 없었다(Fig. 5). 세포 사멸을 억제하는 Bcl-2 단백질은 butyrate를 첨가하지 않았을 때는 발현이 없었으나 butyrate를 첨가하여 72시간 동안 배양한 경우에 도리어 발현이 증가하였다. 세포 사멸을 유도하는 Bax 단백질은 butyrate의 첨가에 관계없이 모든 경우에서 발현이 감소하였다(Fig. 4).



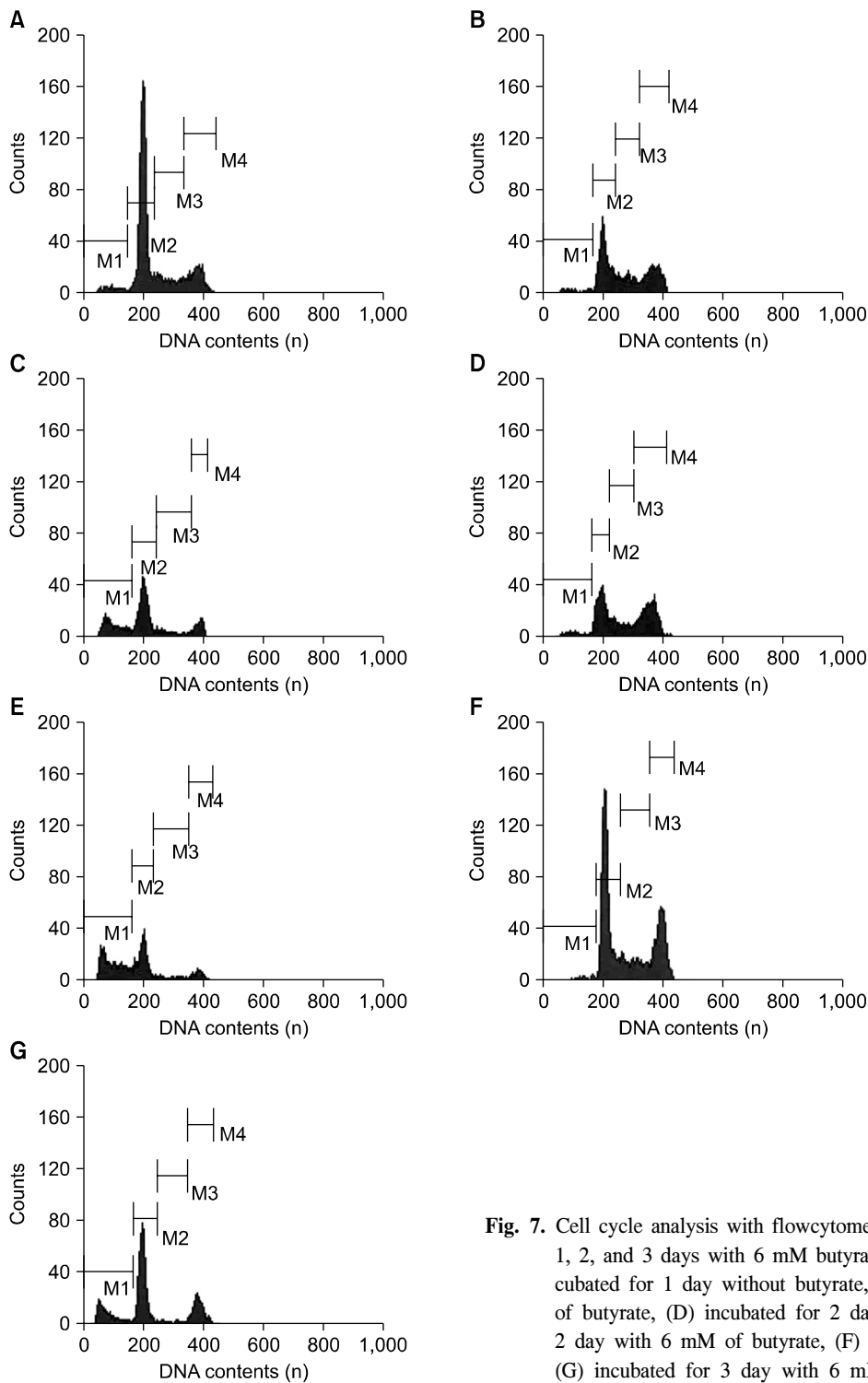
**Fig. 6.** Expression of apoptosis-related gene mRNA induced by butyrate. There was no difference in expression of Bcl-2, Bax mRNA transcripts by butyrate. But survivin mRNA transcript was reduced by butyrate, indicating that the absent expression of survivin protein by butyrate is due to suppression of mRNA transcription.

#### 5) Butyrate에 의한 survivin mRNA 발현 변화

Butyrate에 의한 survivin 단백질 발현의 감소가 유전자 조절에 의한 것인지를 알기 위하여 survivin, Bcl-2 유전자와 Bax 유전자의 발현을 Table 1에 있는 primer로 RT-PCR 방법으로 mRNA의 발현을 측정하였다. Bcl-2 유전자와 Bax 유전자의 발현은 butyrate를 첨가하지 않고 72시간 동안 배양하였을 때는 모두 변화가 없었다. 그러나 butyrate를 첨가하여 72시간 동안 배양하였을 때는 Bcl-2 유전자는 발현이 증가하였으나 Bax 유전자는 발현이 감소하였다. Survivin 유전자는 butyrate를 첨가하지 않은 경우 72시간 후 발현이 증가하였고 butyrate를 첨가하여 배양한 경우에는 72시간 후에 발현이 거의 없었다(Fig. 6).

#### 6) Butyrate에 의한 HCT116 세포의 세포 사멸 변화

HCT116 대장암 세포에 butyrate를 첨가하여 1, 2, 3일 동안 배양하여 유세포 분석을 이용하여 butyrate에 의한 세포 주기의 변화와 세포 사멸의 정도를 측정하였다. G0/G1기의 세포들의 비율은 butyrate의 첨가에 관계없이 변화가 없었으며 S기의 세포들의 비율은 butyrate를 첨가한 경우 현저하게 감소하였다(1일, 19.47% vs 7.26%; 2일, 17.43% vs 5.24%; 3일, 16.99% vs 1.54%). M기의 세포들의 비율도 butyrate를 첨가한 경우 2일 째 가장 감소하였으며 3일째는 감소의 비율이 적었다(1일, 31.55% vs 12.21%; 2일, 43.67% vs 7.83%; 3일, 30.60% vs 20.52%). 세포 사멸을 일으킨 세포들의 비율은 butyrate의 첨가에 의하여 현저하게 증가하였으며 이는 2일 째 가장 심하였다(1일, 1.77% vs 24.97%; 2일, 3.13% vs 47.86%; 3일, 0.70% vs 18.8%) (Fig. 7, 8).

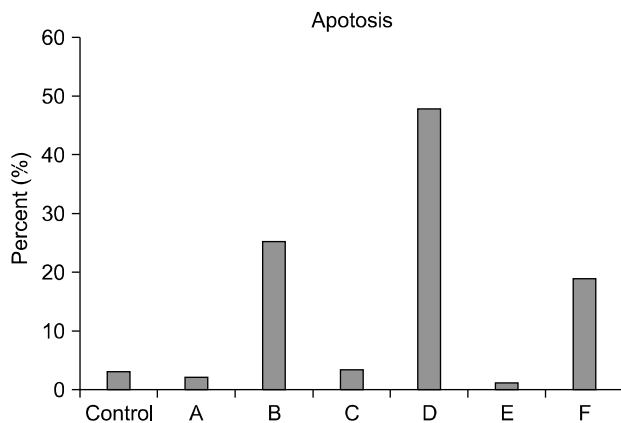


**Fig. 7.** Cell cycle analysis with flowcytometry. HCT116 cells were incubated for 1, 2, and 3 days with 6 mM butyrate. (A) 0 hr, without butyrate, (B) incubated for 1 day without butyrate, (C) incubated for 1 day with 6 mM of butyrate, (D) incubated for 2 day without butyrate, (E) incubated for 2 day with 6 mM of butyrate, (F) incubated for 3 day without butyrate, (G) incubated for 3 day with 6 mM of butyrate.

## 고 찰

대장암은 우리나라에서 4위의 빈도를 보이며 점진적인

증가 추세를 보이고 있다. 대장암의 환경적 요인에는 식이 섭취 양상이 주로 관여하는 것으로 알려져 있다. 고 섬유질 식이와 포화 지방산의 적은 섭취가 대장 직장암의 위험을 감소시킨다는 것은 이미 알려진 사실이다.(5) 포화 지방산



**Fig. 8.** Apoptosis analysis with flowcytometry. HCT116 cells were incubated for 1, 2, and 3 days with 6 mM butyrate. (A) incubated for 1 day without butyrate, (B) incubated for 1 day with 6 mM of butyrate, (C) incubated for 2 days without butyrate, (D) incubated for 2 days with 6 mM of butyrate, (E) incubated for 3 days without butyrate, (F) incubated for 3 days with 6 mM of butyrate. The apoptotic proportion of cell cycle was greatly increased by butyrate (from 3.13% to 47.86 % on 2nd day of incubation, from 0.70% to 18.8% on 3rd day of incubation with butyrate).

의 과다 섭취는 대변내의 이차 담즙산을 증가시키며,(6) 역학 조사에 의해 대변내의 증가된 담즙산의 농도가 대장암의 발생을 촉진하는 인자로 제시되었다.(7) 이차 담즙산인 deoxycholic acid (DCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), lithocholic acid는 일차 담즙산에 대한 장내 세균총의 작용으로 생성된다. Mahmoud 등(8)과 Narisawa 등(9)에 따르면 이차 담즙산에 의해 설치류 대장 상피의 종양이 진행되며, azoxymethane (AOM)으로 처리한 쥐에서 음식에 담즙산중 이차 담즙산인 DCA를 추가한 군에서 AOM만으로 처리한 군보다 더 많은 종양이 생겼다는 동물모델 보고도 있다.(9-11) DCA 같은 이차 담즙산은 대장에서 잘 알려진 종양 촉진 요소로 DCA가 대장의 점막 표면의 상피세포의 탈락을 유도하고 이에 따른 보상기전으로 대장 세포의 과증식이 일어난다고 하였다.(12) Sutherland 등(11)에 의하면 낮은 농도의 이차 담즙산은 대장에서 aberrant crypt foci의 수를 증가시키고, 50  $\mu$ M 이상 농도의 DCA는 대장암 세포의 사멸을 유발하였으며 담즙산에 의해 유도된 세포 사멸이 대장내에서의 담즙산에 의한 종양 촉진에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다.(13)

섬유소는 음식물의 장 통과를 단축시킴으로써 발암 물질의 가능성이 있는 물질과 장점막과의 접촉시간을 줄인다. 또한 변의 부피가 커져 세균의 밀도를 감소시켜 암 발생을

조장할 기회가 적어진다. 섬유소는 대장에서 발효되어 단쇄 지방산인 butyrate를 생성하며,(14) 생성된 butyrate는 대장 상피세포에서 흡수되고, 에너지원으로 이용된다.(15) Butyrate는 4-탄소를 가진 지방산으로 대장직장암 세포의 증식을 방해한다고 알려져 있으며,(16) 동물 모델에서 식이 섬유 섭취는 대장내 butyrate의 농도를 높인다고 보고되었다.(17) Butyrate는 여러 암에서 증식과 분화를 방해하는 것으로 여겨지고 있다.(18) Butyrate는 초기 G1기에서 세포 증식에 장애를 주는 것으로 생각되고 있다.(18) 또한 butyrate는 생리적 농도인 2, 3, 4 mM에서 대장 용종 세포주인 AA/C1 세포주와 대장암 세포주인 PC/JW/FI, HT에서 P53과 무관한 방법으로 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다.(1,19) 본 실험에 사용한 6 mM의 butyrate농도는 생리적인 농도에 근접하여 이 농도에서의 결과가 체내에서의 butyrate의 영향을 대변한다고 할 수 있다. 또한 6 mM butyrate의 HCT116 대장암 세포주에 대한 세포 독성은 butyrate 자체의 세포 독성 효과보다는 세포사멸에 의한 것을 알 수 있었다.

Survivin은 IAP (Inhibitor of apoptosis family)에 속하는 인간의 IAP 동질형 중 하나이다. 모든 IAP는 하나 또는 그 이상의 BIR (Baculovirus IAP Repeat)을 갖고 있으며 BIR은 약 70개의 아미노산으로 구성되어 있다. 현재까지 사람에서는 8개의 IAP가 발견되었다. Survivin은 16.5 kDa의 크기를 가지며 17번 염색체에 위치한다.(20-22) Survivin은 long  $\alpha$ -helix 구조를 갖고 RING finger를 갖지 않고,(23) 구조적으로 하나의 BIR 영역을 갖고 있다. Survivin의 carboxyl terminal의 long  $\alpha$ -helix 구조는 polymerized microtubulin과 상호 작용을 갖는다.(24) Survivin의 발현은 세포 주기에 의해 조절된다. 이것은 IAP군들 중 유일한 성질이며, G2/M기의 장애를 주는 것으로 알려져 있다.(21) Survivin은 세포 자멸사의 조절 뿐 아니라 세포분열과도 관계가 있으나, 최근 연구에 의하면 정상 대장 점막이나 과증식성 용종에서도 발견된다.(22) 이러한 survivin은 사람의 정상 세포에서 발견되기는 하나 그 양은 매우 적다. 그 동안의 연구에 의하면, 암 환자에 있어 survivin의 발현은 불량한 예후, 병의 진행, 생존율의 감소 등 임상적으로 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.(25-28) Survivin은 방광암(transitional cell carcinoma, TCC)에서 불량한 예후인자로 소변 내에서의 survivin의 검출은 예후 예측 인자로서 가치가 있는 검사로 인정된다.(25) 위암에서도 survivin의 발현이 불량한 예후와 세포사멸을 감소시키는 것으로 발표되고 있다.(26) 그러나 어떤 연구에서는 survivin의 세포핵내의 발현은 양호한 예

후와 관련이 있으나, 세포질내의 발현은 불량한 예후와 관련이 없다는 보고도 있다.(27) 대장 직장암에서 survivin의 발현은 bcl-2발현, 중앙 진행, 불량한 생존율과 관련된다. 또한 survivin의 antisense 유전자인 epr-1의 발현 유도는 survivin의 발현을 방해하고 survivin 발현 감소는 세포사멸의 증가, 항암제에 대한 감수성의 증가, 증식의 감소 효과를 보인다.(28)

HCT116 대장암 세포들에 6 mM의 butyrate를 첨가하여 72시간 동안 배양한 결과 세포사멸을 유도하는 Bax 단백질은 butyrate의 첨가와 관계없이 발현이 감소하여 butyrate가 Bax 단백질의 발현에는 영향이 없는 것을 알 수 있었다. 그러나 세포 사멸을 억제하는 survivin은 butyrate를 첨가하지 않은 경우 72시간 후에 발현이 현저하게 증가하는 반면 butyrate를 첨가하여 배양한 경우에는 72시간 후에 전혀 단백질 발현이 없었다. 이는 butyrate가 survivin의 발현을 조절하는 중요한 요인이 되는 것을 시사하여 butyrate를 첨가한 경우에는 세포 사멸을 억제하는 survivin의 발현 감소에 의하여 세포 사멸이 일어날 수 있음을 시사한다. 그러나 butyrate를 첨가한 경우 Bcl-2 단백질의 발현을 증가시켜 Bcl-2와 survivin은 상호 연관성에 대한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. Survivin의 발현 감소가 survivin의 핵 안으로의 이동에 의한 것인지를 알기 위하여 세포질내의 단백질과 핵단백질을 분리하여 실험한 결과 세포질내 뿐 아니라 핵내의 단백질 발현도 감소하는 것을 확인하여 survivin 단백질의 감소는 세포내 전체에서 butyrate에 의한 발현의 억제가 일어나는 것으로 생각된다. 그러나 면역형광 염색에서는 butyrate 처리 후 핵내에서만 survivin 발현이 보여 butyrate에 의한 survivin의 발현의 변화는 주로 세포질내의 survivin의 발현에 영향이 있을 것으로 생각된다. 또한 핵내의 survivin 발현에는 butyrate의 영향이 없던지 아니면 세포질내의 survivin이 핵내로 이동할 가능성이 있어 butyrate에 의한 survivin의 세포 내에서의 위치 변화에 대한 연구가 진행 중이다.

세포사멸에 관여하는 유전자들의 발현은 Bcl-2 유전자와 Bax유전자는 butyrate를 첨가하지 않고 72시간 동안 배양하였을 때 발현의 변화가 없었다. 그러나 butyrate를 첨가하여 72시간 동안 배양하였을 때는 Bcl-2 유전자는 발현이 증가하였으나 Bax 유전자는 발현이 감소하였다. 이는 단백질 발현의 경우와 일치하는 결과이다. Survivin 유전자는 butyrate를 첨가하지 않은 경우 72시간 후 발현이 증가하였고 butyrate를 첨가하여 배양한 경우에는 72시간 후에 발현이 거의 없었다. 이 결과도 단백질의 발현과 일치하는 결과로 butyrate에

의한 survivin의 유전자 발현 억제에 의하여 survivin 단백질의 발현이 감소함을 알 수 있었다.

Butyrate에 의한 HCT116 대장암 세포의 세포 주기의 변화는 G0/G1기의 세포들의 비율은 butyrate첨가에 큰 영향을 받지 않았다. 그러나 S기의 세포들은 대조군에 비해 butyrate를 첨가한 후 1일에 19.47%와 7.26%, 2일에는 17.43%와 5.24%, 3일째에는 16.99%와 1.54%로 현저하게 감소하였다. M기의 세포들의 비율도 butyrate를 첨가한 군에서 대조군에 비해 1일에 31.55%와 12.21%, 2일에 43.67%와 7.83%, 3일째는 30.60%와 20.52%로 특히 2일째 현저하게 감소하였다. 세포사멸을 일으키는 세포들의 비율도 butyrate를 첨가한 경우 특히 2일째 현저한 증가를 보였다(1일 1.77%와 24.97%, 2일에 3.13%와 47.86%, 3일째 0.70%와 18.8%). 즉 butyrate는 HCT116 대장암 세포의 핵산을 합성하는 과정과 유사분열이 일어나는 세포 주기 동안 암세포에 영향을 주어 세포사멸을 유도하는 것으로 추정할 수 있다. 아마도 이 작용은 세포 사멸과 세포주기 중 유사분열의 과정에 중요한 역할을 하는 survivin의 발현 소실에 의한 것으로 추측된다. 아직까지 butyrate의 세포사멸을 조장하는 영향은 다 밝혀지지 않은 상태이며 butyrate의 임상적 독성은 매우 낮은 것으로 발표되고 있어,(29) 앞으로의 연구에 따라 대장암에서 butyrate를 대장암 화학예방제제로 사용할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

## REFERENCES

- 1) Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 1993;55:498-505.
- 2) Bonnotte B, Favre N, Reveneau S, Micheau O, Droin N, Garrido C, et al. Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. *Cell Death Differ* 1998;5:480-7.
- 3) Giardina C, Boulares H, Inan MS. NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF-alpha and Fas ligation: the role of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1999;1448:425-38.
- 4) McMillan L, Butcher SK, Pongracz J, Lord JM. Opposing effects of butyrate and bile acids on apoptosis of human colon adenoma cells: differential activation of PKC and MAP kinases. *Br J Cancer* 2003;88:748-53.
- 5) Sandler RS, Lyles CM, Peipins LA, McAuliffe CA, Woosley JT, Kupper LL. Diet and risk of colorectal adenomas: macro-



- nutrients, cholesterol, and fiber. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:884-91.
- 6) Radley S, Imray CHE, Davis A, Hendrickse CW, Donovan IA, Lawson AM, et al. Duodenal bile acid profiles in patients with colorectal cancer or polyps. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993;5:721-30.
  - 7) Bayerdorffer E, Mannes GA, Richter WO, Ochsenkuhn T, Wiebecke B, Kopcke W, et al. Increased serum deoxycholic acid levels in men with colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1993;104:145-51.
  - 8) Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Bilinski RT, Mestre JR, Chadburn A, Churchill M, et al. Administration of an unconjugated bile acid increases duodenal tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 1999;20:299-303.
  - 9) Narisawa T, Magadia NE, Weisburger JH, Wynder EL. Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:1093-7.
  - 10) Reddy BS, Wynder EL. Large-bowel carcinogenesis: fecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1973;50:1437-42.
  - 11) Sutherland LAM, Bird RP. The effect of chenodeoxycholic acid on the development of aberrant crypt foci in the rat colon. *Cancer Lett* 1994;76:101-7.
  - 12) DeRubertis FR, Craven PA, Saito R. Bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. Evidence for involvement of lipoxigenase products. *J Clin Invest* 1984;74:1614-24.
  - 13) Martinez-Diez MC, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ. Comparison of the effects of bile acids on cell viability and DNA synthesis by rat hepatocytes in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500:153-60.
  - 14) Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981;22:763-79.
  - 15) Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* 1982;42:65-82.
  - 16) Tsao D, Shi ZR, Wong A, Kim YS. Effect of sodium butyrate on carcinoembryonic antigen production by human colonic adenocarcinoma cells in culture. *Cancer Res* 1983;43:1217-22.
  - 17) Boffa LC, Lupton JR, Mariani MR, Ceppi M, Newmark HL, Scalmati A, et al. Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Res* 1992;52:5906-12.
  - 18) Barnard JA, Warwick G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ* 1993;4:495-501.
  - 19) Berry RD, Paraskeva C. Expression of carcinoembryonic antigen by adenoma and carcinoma derived epithelial cell lines: possible marker of tumour progression and modulation of expression by sodium butyrate. *Carcinogenesis* 1988;9:447-50.
  - 20) Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243-52.
  - 21) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
  - 22) Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001;32:119-25.
  - 23) Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell* 2000;6:183-9.
  - 24) Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 1999;344:305-11.
  - 25) Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999;341:452-3.
  - 26) Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:1808-12.
  - 27) Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163:109-16.
  - 28) Yamamoto T, Manome Y, Nakamura M, Tanigawa N. Down-regulation of survivin expression by induction of the effector cell protease receptor-1 reduces tumor growth potential and results in an increased sensitivity to anticancer agents in human colon cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:2316-24.
  - 29) Miller AA, Kurschel E, Osieka R, Schmidt CG. Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23:1283-7.