

피자두(*Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam) 미숙과의 apoptosis 유도 효과

유미희 · 임효권 · 황보미향 · 이지원 · 이인선^{1,*}

계명대학교 식품가공학 전공, ¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR) 센터

Induction of Apoptosis by Immature *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam

Mi Hee Yu, Hyo Gwon Im, Mi Hyang Hwang Bo, Ji Won Lee, and In-Seon Lee^{1,*}

Department of Food Science and Technology, Keimyung University
¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

Apoptosis of *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam, which possesses hematopoiesis, osteoporosis prevention, and antimutagenic effects, at different growth stages was evaluated. Cytotoxic effect of acetone extracts of immature fruits against various tumor cell lines was higher than that of mature fruits, particularly in hormone-independent human breast cancer, MDA-MB-231 cell line. Immature fruit extract increased expression level of pro-apoptotic protein Bax and reduced that of anti-apoptotic protein Bcl-2, and stimulated caspase-3 activity in MDA-MB-231 cells. Results suggest immature fruit of *P. salicina* Lindl. cv. soldam to be natural source for development of functional food and medical agents to prevent human breast cancer.

Key words: *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam, apoptosis, human breast cancer

서 론

활성 산소를 비롯하여 스트레스, 공해, 화학약품 등 여러 환경적 요인들에 의해 발생되고 있는 암은 전 세계적으로 인간의 생명을 위협하는 가장 중요한 요인으로 지목되고 있다. 특히 고도로 산업화가 이루어진 많은 국가에서는 각종 암이 사망 원인의 수위를 차지하고 있으며 이를 제어하기 위한 꾸준한 연구와 투자에도 불구하고 아직도 암 치료율은 약 40% 정도에 불과하다. 그 중 유방암은 현재 우리나라 여성암 중 두 번째로 많은 빈도를 나타내는 악성종양으로서, 식생활의 서구화로 최근에 발생률이 늘어가고 있는 추세이고 사망 원인의 수위를 차지하고 있다(1). 암 치료에는 항암제를 투여하거나 방사선을 이용하는 방법이 많이 사용되고 있으나 그 폐단 및 부작용이 심각해짐에 따라 항암제를 이용한 암의 치료와는 다른 새로운 개념의 암의 화학적 예방법이 도입되어 암 치료는 물론 예방 차원에서 인류가 오랫동안의 경험을 통해 안전성이 확인된 식이 성분들을 이용하려는 노력이 꾸준히 이루어지고 있다(2). 현재 각종 과채류에 다량으로 존재하는 천연물질 flavonoid 류와 산성 페놀화합물들이 항산화성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리활성 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀져 이에 대한 검

색이 활발히 진행되고 있다(3-6).

Apoptosis는 세포 내부에 프로그래밍된 신호를 따라 여러 유전자의 발현 및 단백질들의 활성이 조절되어 일어나는 능동적인 세포사이며, 그 과정을 통해 생성된 apoptotic body들은 주변의 세포들이나 대식세포 등의 식세포 작용에 의해 제거됨으로써 염증을 유발하지 않는다(7). 반면 세포괴사는 외부적 환경의 변화에 의해 급격히 일어나는 수동적 죽음이며, 염색사의 불규칙한 응집과 세포질의 팽창 과정을 거치게 되고, 최종적으로 세포들의 분해를 통해 세포 파편이 생성되고 이들이 염증을 유발하게 된다(8). Apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 유전자 중에서 제일 먼저 발견된 것이 암 유발유전자인 Bcl-2(B cell lymphoma-2)이며(9), Bax와 함께 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 한다(10). 또한 caspase는 세포사멸 시 활성화 되는 단백질 분해효소이므로 caspase의 활성을 통하여 세포사멸의 정도를 파악할 수도 있다(11).

한편 자두는 신라 시대 때부터 재배되어 오고 있는 오래된 과실로 장미과 뽕나무속 자두아속에 속하며, 원산지에 따라 동양계 자두(*Prunus salicina*), 유럽계 자두(*Prunus domestica*) 및 북미 원산의 미국 자두(*Prunus americana*)로 나눌 수 있다. 동양계 자두의 품종은 크게 대석조생, 뷰티, 포모사, 산타로사, 솔담 등이 있으며, 그중 피자두는 솔담(Soldam)품종으로 주로 8월 중순에 수확되고, 속과 길이 북으며 과육은 부드럽고 유연하고 즙이 많으며 감미는 높고 산미가 적당하나 향기가 적은 특징을 가진다(12). 자두는 예로부터 간장 치료제로 이용되었고, 민간에서는 젓이 붓거나 유선염에 걸렸을 경우 자두를 눌러 붙이기도 했으며, 최근에는 자두가 골다공증 예방, 여성호

*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, 1000 Sindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5538
Fax: 82-53-580-5538
E-mail: inseon@kmu.ac.kr

르몬 형성, 주름살 예방, 피부 보호, 빈혈 예방, 식욕 증진, 스트레스 해소 및 피로 회복에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(13). 최근 자두는 flavonoid와 phenolic acid와 같은 천연 페놀 화합물을 다량 함유하고 있어(14) 우리가 일상 섭취하는 천연 항산화제의 기능을 가지며, 특히 Wang 등(15)은 자두가 사과보다 4.4배의 높은 항산화능을 가진다고 보고하였다. 그러나 피자두를 포함한 자두류에 관한 연구는 아직도 미비한 실정이며, 특히 미숙과에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 또한 인간 유방암 세포에 대한 피자두의 항암효과에 대한 연구는 거의 부재한 편이어서 정립된 이론이 없으며 그에 대한 분자생물학적 기전 또한 확실히 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 생육시기별로 채취한 피자두의 아세톤 추출물의 세포독성효과를 조사하였고, 특히 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포주를 사용하여 피자두의 유방암 세포의 세포주기에 미치는 영향과 세포사 관련 조절 단백질의 발현 양상을 분석함으로써 피자두의 유방암 억제 기전을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 피자두는 경북 김천 지역의 자두 농장에서 2002년 6월부터 미숙과를 채취하여 완숙과에 이르기까지 8단계의 자두를 수확하였다(Table 1). 이 때 가장 먼저 채취한 미숙 피자두를 피자두 1이라 명명하였고, 마지막에 채취한 완숙 피자두를 피자두 8이라 명명하였다. 최종 수확 20-40일 전까지의 녹색을 띄는 피자두 1-4의 경우는 미숙과로, 최종 수확 20-40일 전까지의 녹색/붉은색의 피자두 5-6은 중간숙과, 최종 수확 0-10일전까지의 붉은색 피자두 7-8의 경우는 완숙과로 구분하였다.

시료의 제조

깨끗이 수세한 피자두 500 g을 60% acetone에 침지하여 상온에서 24시간 정치 추출한 후 여과지(Whatman No. 1, England)로 여과하여 상등액을 취하였다. 침전물은 다시 위와 같은 조작을 3회 반복하여 상등액만을 취하였고 이를 감압 농축기로 농축하여 아세톤을 증발시킨 후 수용성 성분만을 회수하기 위하여 증류수로 용해하고 여과지로 클로로필을 여과한 다음, 수용액을 동결 건조하여 -20°C 에 보관하면서 시료로 사용하였다.

암세포 성장 저해 효과

세포주 배양: 본 실험에 사용된 암세포주는 모두 6종이며 한

국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다. 인간유래 간암 세포주인 Hep G2, 위암세포주인 KatoIII, 자궁암세포주인 Hela 및 혈액암세포주인 U937, 호르몬 의존성 유방암세포주인 MCF 7과 호르몬 비의존성 유방암세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 암세포의 성장 저해 효과를 살펴보았다. 이들 세포들은 RPMI-1640 배지 및 MEM 배지에 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic을 첨가하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 2-3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포독성 측정: 시료의 cytotoxicity를 측정하기 위하여 Green 등(16)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 먼저 배양한 세포를 1×10^4 cells/well의 농도로 96-well microtiter plate의 각 well에 200 μL 씩 분주하고 24시간 배양하였다. 멸균 증류수에 녹인 각 시료를 membrane filter(0.45 μm)로 제균하여 20 μL 씩 첨가하고 48시간 배양한 다음, MTT(5 mg/mL) 용액 10 μL 를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 측정된 흡광도로부터 다음과 같이 cytotoxicity를 구하여 세포 성장 억제 효과의 지표로 하였다.

Cytotoxicity(%) =

$$\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

Hemocytometer를 이용한 세포성장률

세포 배양용 6-well plate에 MDA-MB-231 세포주를 1×10^6 cells로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 피자두 추출물을 첨가하여 6시간 간격으로 PBS에 부유시킨 세포를 0.4% trypan blue와 동량으로 섞어 염색한 후 hemocytometer를 사용하여 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

Fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis

Cell cycle을 분석하기 위하여 MDA-MB-231 세포주(3×10^5 cells)에 피자두 추출물을 첨가하고 PBS로 세척한 후 에탄올을 가하여 세포를 고정시켰다. RNase를 함유한 sodium citrate buffer를 첨가하여 세포내의 RNA를 제거하였다. Propidium iodide 용액으로 DNA를 염색하고자 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 FACS 분석을 통하여 세포주기 분석을 하였다.

DAPI staining

MDA-MB-231 세포주를 well당 2×10^4 의 세포수가 되도록 분주하고 24시간 배양한 후 피자두 1의 추출물을 첨가하여 6시간 배양하였다. PBS로 세척한 후 4% paraformaldehyde를 첨가

Table 1. Harvest date of *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam

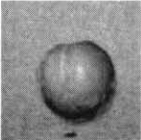
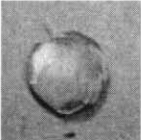

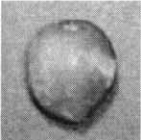

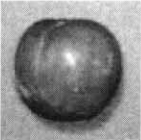


	Sample No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Harvest date (2002)	6/26	7/01	7/06	7/11	7/16	7/21	7/26	7/31
Feature								

Table 2. Cytotoxic effect of acetone extracts from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam in Hep G2, Kato III, Hela cells

Cell line	Concentration (mg/mL)	Cell growth (O.D.) / (Inhibition rate (%))							
		Sample							
		1	2	3	4	5	6	7	8
HepG2	0.5	0.39±0.03 (35)	0.39±0.03 (17)	0.47±0.02 (22)	0.62±0.06 (4)	0.55±0.06 (9)	0.51±0.06 (15)	0.69±0.05 (-)	0.76±0.09 (-)
	1	0.13±0.04 (77)	0.50±0.12 (32)	0.40±0.02 (34)	0.52±0.04 (13)	0.49±0.04 (18)	0.47±0.04 (21)	0.54±0.03 (10)	0.63±0.02 (-)
	2	0.08±0.02 (87)	0.10±0.03 (86)	0.08±0.01 (86)	0.16±0.03 (70)	0.39±0.05 (35)	0.46±0.13 (23)	0.35±0.03 (41)	0.58±0.06 (4)
	4	0.07±0.01 (87)	0.09±0.01 (84)	0.09±0.01 (84)	0.12±0.03 (79)	0.16±0.02 (72)	0.20±0.05 (66)	0.26±0.02 (56)	0.28±0.05 (54)
Kato III	0.5	0.26±0.01 (32)	0.20±0.01 (48)	0.21±0.01 (45)	0.14±0.01 (62)	0.21±0.02 (46)	0.23±0.02 (30)	0.28±0.02 (15)	0.22±0.01 (33)
	1	0.14±0.01 (63)	0.23±0.01 (40)	0.19±0.01 (49)	0.13±0.01 (66)	0.19±0.02 (50)	0.19±0.01 (41)	0.20±0.01 (39)	0.22±0.01 (32)
	2	0.06±0.01 (83)	0.13±0.01 (65)	0.09±0.01 (77)	0.13±0.01 (66)	0.20±0.01 (47)	0.21±0.01 (37)	0.18±0.01 (46)	0.21±0.01 (36)
	4	0.08±0.01 (79)	0.09±0.01 (76)	0.09±0.02 (76)	0.04±0.01 (89)	0.09±0.01 (77)	0.13±0.01 (59)	0.15±0.01 (53)	0.25±0.01 (24)
Hela	0.5	0.05±0.01 (57)	0.08±0.01 (27)	0.12±0.01 (-)	0.12±0.09 (-)	0.14±0.05 (-)	0.12±0.06 (-)	0.14±0.07 (-)	0.15±0.03 (-)
	1	0.03±0.01 (69)	0.04±0.01 (65)	0.08±0.01 (33)	0.08±0.01 (26)	0.14±0.01 (-)	0.13±0.01 (-)	0.15±0.01 (-)	0.15±0.07 (-)
	2	0.03±0.01 (74)	0.04±0.01 (67)	0.05±0.01 (56)	0.04±0.01 (61)	0.06±0.01 (42)	0.13±0.01 (-)	0.13±0.01 (-)	0.13±0.01 (-)
	4	0.02±0.01 (76)	0.03±0.01 (68)	0.03±0.01 (71)	0.03±0.01 (72)	0.02±0.01 (76)	0.07±0.01 (41)	0.04±0.01 (65)	0.08±0.01 (18)

The values are mean ± standard deviation (n=5).

하여 30분간 세포를 고정시킨 후 PBS로 2회 세척하여 DAPI solution의 최종 농도가 1 µg/mL이 되도록 세포에 첨가하여 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 염색 용액을 제거한 후 PBS로 세척하고 372 nm에서 형광현미경을 이용하여 200배의 배율로 세포핵의 형태변화를 관찰하였다.

Western blot analysis

MDA-MB-231 cell로부터 단백질 분리: MDA-MB-231 세포주를 6-well plate에 1×10⁶ cells/5 mL로 분주하고 피자두 1의 추출물을 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 120×g에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 그 침전물에 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16 uM PMSF) 50 µL를 첨가하여 -70°C에서 lysis 시킨다. 4°C에서 16,609×g로 10분간 원심분리하여 그 상등액으로 BCA kit를 사용하여 단백질을 정량하였다.

단백질 전기영동: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 위하여 먼저 10% running gel과 4.5% stacking gel을 제조하였다. 이때 분리한 단백질의 농도를 50 µg으로 조정하고 95°C에서 5분간 가열한 후 준비된 gel에 분주하여 20 mA에서 전기영동하였다.

Western blotting: 전기영동을 하여 분리한 단백질은 im-mobilon-P transfer membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)과 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Tris-Hcl, 192 mM glycine)를 사용하여 180 mA에서 90분간 전이시켰다. 계속하여 특

정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체를 반응시키고 TTBS으로 세척한 후 마지막에 증류수로 세척하고 membrane에 ECL(enhanced chemiluminescence) 용액을 도포하고, X-ray film에 노출하여 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다.

Caspase-3 activity assay

MDA-MB-231 세포주를 6-well plate에 2×10⁶ cells로 분주하고 24시간 배양한 후 피자두 1의 추출물을 처리하여 6시간 배양시켰다. 배양한 세포를 2×10⁶ cells로 counting 한 후 400×g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 그 침전물에 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16 uM PMSF)로 lysis 시켰다. caspase-3 기질을 첨가하여 37°C에서 1시간 이상 반응시킨 후 405 nm에서 caspase activity를 측정하였다(17).

결과 및 고찰

세포독성 측정

인간 유래의 간암세포 Hep G2와 위암세포 Kato III, 자궁경부암세포 Hela, 백혈암세포인 U937 및 호르몬 의존성 유방암 세포인 MCF 7, 호르몬 비의존성 유방암세포인 MDA-MB-231에 대한 피자두 추출물의 성장 저해 효과를 살펴본 결과, 피자두 추출물은 농도 의존적으로 모든 암세포주에 대해 성장 저해 효과를 보였으며 특히 미숙과 추출물에서 높은 성장 저해 효과를 보였다. Hep G2에 대한 피자두 추출물의 성장 저해 효과를 살펴 본 결과(Table 3), 피자두 1의 추출물은 1 mg/mL의

Table 3. Cytotoxic effect of acetone extracts from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam in U937, MCF 7, MDA-MB-231 cells

Cell line	Concentration (mg/mL)	Cell growth (O.D.) / (Inhibition rate (%))							
		Sample							
		1	2	3	4	5	6	7	8
U937	0.5	0.37±0.04 (30)	0.45±0.03 (8)	0.59±0.05 (-)	0.52±0.02 (-)	0.56±0.01 (-)	0.57±0.02 (-)	0.58±0.12 (-)	0.64±0.08 (-)
	1	0.19±0.04 (65)	0.34±0.09 (34)	0.58±0.03 (-)	0.60±0.04 (-)	0.54±0.03 (-)	0.65±0.06 (-)	0.63±0.07 (-)	0.52±0.09 (-)
	2	0.25±0.13 (69)	0.27±0.06 (50)	0.23±0.03 (60)	0.37±0.02 (27)	0.52±0.06 (-)	0.59±0.06 (-)	0.49±0.07 (-)	0.45±0.06 (15)
	4	0.09±0.01 (89)	0.19±0.08 (76)	0.21±0.02 (64)	0.23±0.02 (58)	0.27±0.01 (48)	0.29±0.03 (39)	0.32±0.03 (38)	0.48±0.08 (11)
MCF 7	0.5	0.46±0.01 (-)	0.39±0.02 (-)	0.37±0.01 (-)	0.39±0.03 (-)	0.38±0.03 (-)	0.45±0.01 (-)	0.40±0.02 (-)	0.50±0.03 (-)
	1	0.29±0.01 (24)	0.33±0.02 (14)	0.33±0.02 (15)	0.35±0.01 (10)	0.28±0.03 (26)	0.28±0.01 (26)	0.28±0.02 (26)	0.37±0.03 (3)
	2	0.22±0.01 (42)	0.26±0.00 (31)	0.24±0.02 (37)	0.21±0.01 (45)	0.29±0.02 (24)	0.33±0.02 (15)	0.31±0.03 (20)	0.25±0.01 (33)
	4	0.17±0.01 (65)	0.16±0.01 (55)	0.13±0.01 (53)	0.12±0.00 (63)	0.20±0.01 (38)	0.21±0.09 (46)	0.31±0.03 (15)	0.39±0.03 (16)
MDA-MB-231	0.5	0.33±0.04 (3)	0.31±0.05 (10)	0.41±0.01 (-)	0.36±0.01 (-)	0.40±0.01 (-)	0.39±0.01 (-)	0.38±0.02 (-)	0.42±0.00 (-)
	1	0.03±0.00 (89)	0.24±0.00 (30)	0.16±0.00 (53)	0.25±0.01 (27)	0.46±0.01 (-)	0.38±0.01 (-)	0.36±0.03 (-)	0.45±0.00 (-)
	2	0.03±0.01 (90)	0.03±0.00 (90)	0.01±0.00 (96)	0.06±0.01 (82)	0.15±0.01 (56)	0.07±0.00 (77)	0.39±0.02 (-)	0.37±0.00 (-)
	4	0.01±0.01 (97)	0.01±0.01 (96)	0.01±0.00 (95)	0.02±0.01 (92)	0.02±0.00 (93)	0.01±0.00 (93)	0.03±0.01 (90)	0.09±0.02 (72)

The values are mean ± standard deviation (n=5).

농도에서 77%의 비교적 높은 저해 효과를 보였으며, 2 mg/mL의 농도에서도 87%의 높은 저해 효과를 보였다. 그리고 피자두 2, 3의 추출물의 경우는 2 mg/mL 이상의 농도에서 85% 정도의 저해 효과를, 피자두 4의 추출물은 2-4 mg/mL의 농도에서 70-79%의 저해 효과를 보였으나, 피자두 5-8의 추출물은 가장 높은 농도인 4 mg/mL에서도 55-72% 정도의 비교적 낮은 생육 저해 효과를 보였다. 따라서 피자두 추출물 중 미숙과에서 간암세포에 대한 높은 생육 저해 효과를 보였고, 피자두가 성숙될수록 저해 효과가 감소됨을 확인하였다.

위암 세포주인 Kato III에 대한 피자두 추출물의 생육 저해 효과를 살펴 본 결과(Table 3), 피자두 1의 추출물은 2 mg/mL의 농도에서 80% 이상의 저해율을 보였고 최고 농도인 4 mg/mL에서 피자두 1-4의 추출물은 76-91%의 저해 효과를 보였으나 피자두 성숙과의 경우는 비교적 낮은 저해 효과를 보였다.

자궁암 세포주인 Hela에 대한 피자두 추출물의 생육 저해 효과를 살펴보면(Table 3) 피자두 1의 추출물은 1-4 mg/mL의 농도에서 69-76% 정도의 비교적 낮은 저해 효과를 보였고 나머지 다른 추출물은 4 mg/mL의 농도에서 약 18-76% 정도의 낮은 저해 효과를 보였으며, 백혈암 세포인 U937에 대해서는 피자두 1의 추출물이 1-4 mg/mL의 농도에서 65-89%의 생육 저해 효과를 보여 자궁암 세포주에 비해 높은 생육 저해 효과를 보였으나 간암 및 위암 세포주에 비해 낮은 생육 저해 효과를 나타내었다(Table 4).

호르몬 의존성 유방암 세포인 MCF-7에 대한 피자두 추출물의 저해 효과(Table 4)는 4 mg/mL의 농도에서도 미숙과인 피자두 1-4의 경우에만 65% 정도의 저해율을 보였고 다른 추출물

의 경우는 호르몬 의존성 유방암 세포주에 대한 저해 효과를 보이지 않았다. 그러나 호르몬 비의존성 유방암 세포인 MDA-MB-231에 대해서는 피자두 1의 추출물의 경우 1 mg/mL 농도에서 89%의 높은 저해율을 보였고 4 mg/mL 농도에서는 97%의 저해 효과를 보여 모든 암세포주 중에서 가장 높은 생육 저해 효과를 나타내었다(Table 4). 피자두 2, 3, 4에서는 2 mg/mL의 농도에서 90-96%의 높은 저해 효과를 확인하였고, 4 mg/mL의 농도에서는 성숙과인 피자두 8을 제외한 모든 시료에서 90% 이상의 높은 생육 저해 효과를 보였다. 따라서 다른 암세포주에 비해 호르몬 비의존성 유방암세포인 MDA-MB-231에 대한 피자두 추출물의 성장 저해 효과가 가장 높음을 알 수 있었다.

과일이 숙성될 때는 starch의 가수분해, chlorophyll 형질전환에 관여하는 chloroplasts가 chromoplasts로의 전환, carotenoid, anthocyanin 및 phenolic 화합물의 생성, 그리고 휘발성 화합물 등이 형성된다(18,19). 따라서 성숙과는 미숙과에 비해 각종 유기산 및 안토시안계 색소들이 많이 함유(20)되어 있어 미숙과에 비해 암세포 성장 저해 효과가 더 높을 것으로 생각되었으나, 오히려 성숙과의 암세포 성장 저해 효과가 감소되었다. 이는 암세포 성장 억제 효과를 가지는 페놀 화합물의 경우, 자두류의 미숙과가 완숙과로 숙도가 진행됨에 따라 총페놀 함량과 총산 함량이 점차 감소된다는 보고(21,22)와 관련되는 것으로 보여진다.

Hemocytometer를 이용한 세포성장률

피자두 1의 추출물이 농도별, 시간별로 MDA-MB-231 세포주의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 trypan blue 염색의

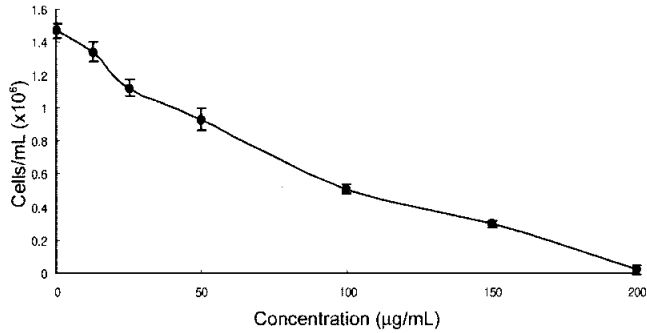


Fig. 1. Effect of acetone extract from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam 1 on MDA-MB-231 cell growth.

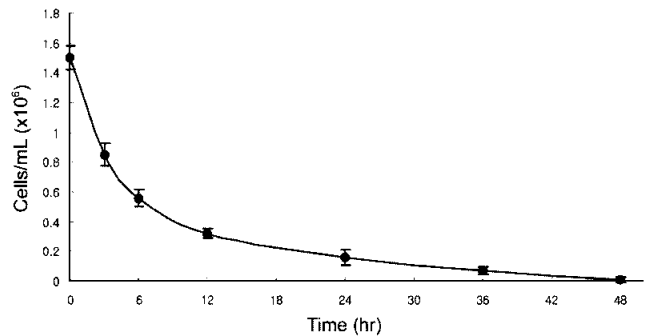


Fig. 2. The time course of MDA-MB-231 cell growth treated with acetone extract (100 µg/mL) from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam 1.

로 생존 및 사멸 세포수를 계수하여 확인하였다. 피자두 추출물을 처리하지 않은 대조군과 각 농도별로 처리한 군에서 24시간 경과 후 생존 세포수는 Fig. 1에서와 같다. 시료 무첨가구에서는 세포수가 1.0×10^6 cells에서 1.5×10^6 cells로 증가하였으나, 100 µg/mL의 농도에서는 5×10^5 cells로 감소하였고, 200 µg/mL의 농도에서는 1×10^5 cells로 감소하는 현상을 나타내었다. 또한 시간에 따른 피자두 1 추출물의 MDA-MB-231 세포주의 성장에 미치는 영향을 100 µg/mL의 농도로 고정하고 6시간 간격으로 세포의 생존수를 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. 시료 무첨가구에서는 역시 세포수가 1.0×10^6 cells에서 1.5×10^6 cells로 증가하였으나 피자두 추출물 처리구에서는 6시간이 지

난 후 생존 세포수는 절반가량 감소하는 현상을 보였고, 48시간이 지난 후 세포는 거의 사멸하였다.

MDA-MB-231 세포 핵의 형태학적 변화

Apoptosis의 경우 초기 단계에는 세포질이 농축되고 핵막이 변하지만 소기관들의 형태가 정상적으로 유지되는 것이 특징이다(23). 진행된 과정에서 두드러진 특징은 핵의 분할 및 세포질의 위축으로 apoptotic body가 생기고 마지막으로 대식세포에 흡입된다고 한다(24). 피자두 추출물 무첨가구의 세포와 추출물을 첨가한 세포를 위상차 현미경으로 관찰한 결과 대조군의 세포핵은 둥글고 완전한 반면 시료를 처리하여 DAPI로 형광 염색한 세포핵의 모양은 위축되었거나 부정형으로 바뀌었고 전형적인 apoptosis 세포의 특징인 세포막의 수포화 현상을 보였다(Fig. 3).

피자두 미숙과 추출물이 세포주기에 미치는 영향

세포 주기는 합성전기(G₁ phase), 합성기(S phase), 합성후기(G₂ phase), 그리고 유사분열기(M phase)로 나누어진다. 세포주기와 관련된 apoptosis 유도는 Sub G₁ phase에서 전형적으로 나타나게 된다(25). MDA-MB-231 cells의 농도에 따른 세포 사멸 분석 결과 피자두 추출물을 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 세포사멸이 진행된 세포는 66.97%였고, 400 µg/mL에서는 83.91%, 800 µg/mL에서는 90.63%로 그 비율이 증가하였다(Fig. 4A). 시간별 세포 사멸은 피자두 추출물의 처리 6시간 후, 세포사멸이 진행된 세포는 78.91%이며, 24시간, 48시간에 각각 85.71%, 91.19%의 비율로 높게 나타났다(Fig. 4B). Nakagama 등(26)은 genistein의 MDA-MB-231 세포주에 대한 apoptosis 유도를 보고하였고, 강 등(27)은 인삼추출물을 2 mg/mL의 농도로 처리했을 때 세포주에서 76.6%의 세포사멸이 일어났음을 보고하였다. 이와 비교했을 때 피자두의 미숙과 추출물은 MDA-MB-231 유방암 세포에 대해서 높은 apoptosis 유도 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

피자두 미숙과 추출물이 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Bcl-2 family 단백질 발현: 세포들은 외부의 여러 자극들의 변화에 의해 매우 민감하게 반응하며, 자극의 종류나 강도에 따라 필요시 매우 정밀한 세포 사멸 신호 전달 과정을 작동하게 된다. 수십년간의 연구를 통하여 세포사멸 과정을 유도하거

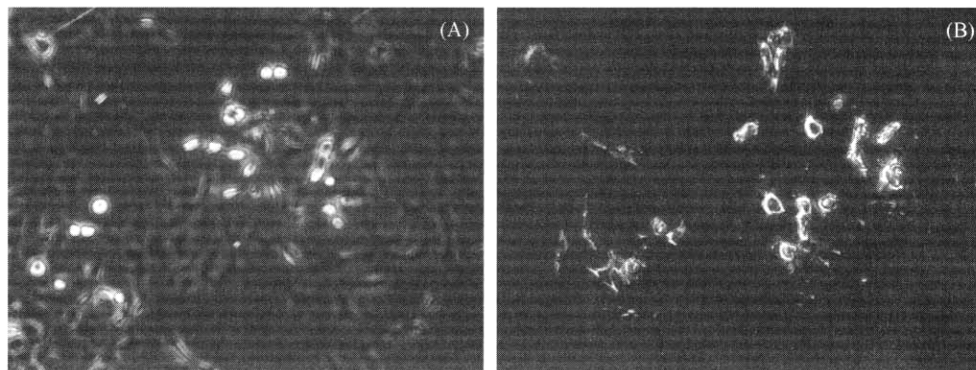


Fig. 3. Apoptotic nuclear condensation of MDA-MB-231 cells treated with acetone extract (100 µg/mL) from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam 1 (200).

A: Control, B: The acetone extract.

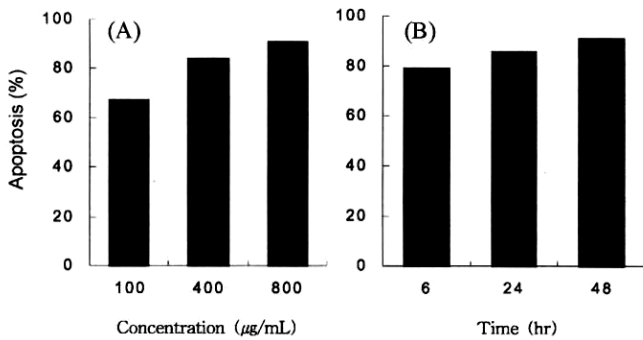


Fig. 4. Cell cycle of MDA-MB-231 cells treated with the acetone extract from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam 1 using Fluorescence Activated Cell Sorter analysis.

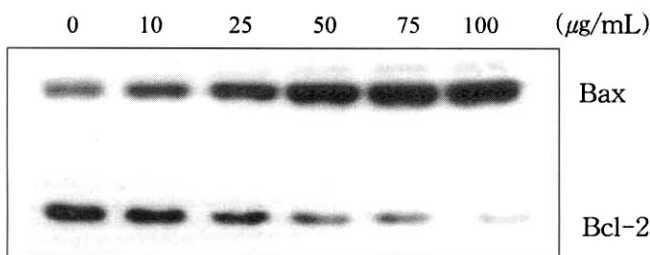


Fig. 5. Effect of acetone extracts from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam 1 on expression levels of Bcl-2 family proteins in MDA-MB-231 cells.

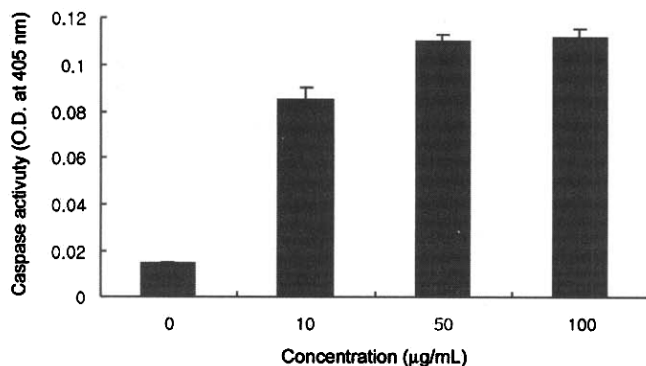


Fig. 6. Effect of various concentration of acetone extracts from *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam 1 on caspase-3 activity in MDA-MB-231 cells.

나, 조절할 수 있는 여러 세포 인자들이 밝혀졌다. Bcl-2 family에 속하는 여러 단백질들은 apoptosis에서 중요한 역할을 하는데 이들 중 Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-xs 등은 apoptosis를 촉진하는 역할을 하며, Bcl-2, Bcl-xL 등은 apoptosis를 억제하는 기능을 가진다고 보고되었다(28). Bcl-2 family 중 Bax와 Bcl-2의 단백질 발현을 Western blot 방법으로 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. 피자두의 추출물을 다양한 농도로 처리한 결과 Fig. 5와 같이 apoptosis를 유도하는 Bax의 단백질 발현은 농도에 비례하여 증가한 반면 apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질은 농도에 비례하여 발현이 감소하였다. 이 결과 Bax 단백질 발현의 증가와 Bcl-2 단백질 발현의 감소는 피자두 추출물이 apoptosis를 유도함을 확인할 수 있었다.

Caspase-3 activity: Caspase 3는 Yama, Apopain 등으로 불리는 유전자로써 과발현될 경우 apoptosis가 유도되고(29), caspase-3 activity inhibitor를 사용하면 apoptosis가 억제되는 등 apoptosis에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(30). 따라서 피자두 추출물이 유도하는 apoptosis 과정의 신호 전달 기전을 알아보고자 caspase-3의 활성을 관찰하였다(Fig. 6). MDA-MB-231 세포주에 피자두의 미숙과 추출물을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 첨가하여 caspase-3의 활성을 측정하고 결과 농도 의존적으로 그 활성이 증가되는 것을 알 수 있었다. 피자두 추출물 무첨가구를 1로 보았을 때 농도별로 각각 5.7, 7.4, 7.5 배의 caspase-3 활성 증가를 보였으며, 이는 Nam 등(31)이 보고한 HL-60 세포주에서 권백 추출물을 100, 200, 400 µg/mL의 농도로 처리하였을 경우 각각 0.8, 1.3, 2.11배로 caspase-3 활성이 증가했다는 보고와 비교해보아도 MDA-MB-231 세포주에 피자두 추출물을 처리하였을 때의 caspase-3 활성의 증가는 권백 추출물보다 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다.

따라서 피자두의 미숙과 추출물은 apoptosis를 유도하는 유전자인 Bcl-2 family에 영향을 미치는 것으로 보여지며, 순차적으로 caspase-3 활성을 촉진시켜 호르몬 비의존성 유방암 MDA-MB-231 세포주의 apoptosis의 유도에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 앞으로 이들 활성성분들의 규명과 인체실험과 더불어 피자두 미숙과에 대한 독성평가가 병행된다면 항암과 관련된 기능성 식품과 치료제 등의 개발에 있어 천연소재로서 피자두 미숙과의 유용성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 생육시기별로 피자두를 수확한 후 피자두의 아세톤 추출물을 이용하여 인간 유래 간암, 위암, 자궁암, 백혈암 및 유방암 세포주에 대한 세포독성효과를 조사하였고, 특히 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포주를 사용하여 피자두의 유방암 세포의 세포주기에 미치는 영향과 세포사 관련 조절 단백질의 발현 양상을 분석함으로써 피자두의 유방암 억제 기전을 살펴보았다. 인간유래의 암세포주를 이용하여 피자두 추출물의 성장 저해 효과를 측정하고 결과, 농도 의존적으로 모든 암 세포주에 대해 성장 저해 효과를 보였으며, 특히 피자두 1:4의 미숙과 추출물에서 높은 성장 저해 효과를 보였다. 특히 호르몬 비의존성 유방암세포인 MDA-MB-231에 대한 피자두 추출물의 성장 저해 효과는 4 mg/mL의 농도의 모든 추출물에서 높은 효과를 보였으며, 피자두 1의 추출물에서는 97%의 높은 성장 저해 효과를 보였다. MDA-MB-231 세포주에 피자두 미숙과 추출물을 처리했을 때 apoptosis를 유도하는 유전자인 Bcl-2 family에 영향을 미치는 것으로 보여지며, 순차적으로 caspase-3 활성이 촉진되고, 이것에 의해 apoptosis가 유도되는 것으로 생각된다. 앞으로 이들 활성성분들의 규명과 인체실험과 더불어 피자두 미숙과에 대한 독성평가가 병행된다면 항암과 관련된 기능성 식품과 치료제 등의 개발에 있어 천연소재로서 피자두 미숙과의 유용성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

문헌

1. Byrd JC, Park JHY, Schaffer BS, Garmroudi F, MacDonald PG. Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 25: 18647-18656 (2000)
2. Rho SN, Oh HS. Effect of Omija extracts on the growth of liver cancer cell line SNU-398. *Korean J. Nutr.* 35: 201-206 (2002)
3. Kim SH, Kim HY. Aging. pp 83-85. Minumsa, Daewoo series of science texts, Seoul, Korea (1995)
4. Ames BN, Saul RL. Oxidative DNA damage, cancer and aging. Oxygen and human disease. *Ann. Inter. Med.* 107: 536-539 (1987)
5. Kim JH. Antioxidative activity and pharmaco-constituents of *Houttuynia herba* MS thesis, Sookmyung Woman's University, Seoul, Korea (1998)
6. Shin UY. Studies on biological activities of *Sparganium erectum*. PhD thesis, Dongduk Woman's University, Seoul, Korea (1998)
7. Clarke PG, Clarke S. Historic apoptosis. *Nature.* 378-230 (1995)
8. Robaye, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am. J. Pathol.* 138: 447-453 (1991)
9. Tsujimoto Y, Crossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the BCL-2 gene in Human Follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443 (1985)
10. Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Murak S, Guyton RA, Vinten JJ. Adenosine attenuated reperfusion induced apoptotic cell death by modulation expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33: 57-68 (2001)
11. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449 (1995)
12. Kim HJ, Yu MH, Lee SO, Park JH, Park DC, Lee IS. Effects of plum fruits extracts at different growth stages on quinone reductase induction and growth inhibition on cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 1445-1450 (2004)
13. Sung YJ, Kim YC, Kim MY, Lee JB, Chung SK. Approximate composition and physicochemical properties of plum (*Prunus salicina*). *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 45: 134-137 (2002)
14. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81: 321-326 (2003)
15. Wang H, Cao G, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705 (1996)
16. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Method* 70: 257 (1984)
17. Gurtu V, Kain SR. and Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem.* 251: 98-102 (1997)
18. Ana LV, Luiz CT. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem.* 71: 5216-5220 (2000)
19. Valero D, Martinez-Romero D, Valverde JM, Guillen F, Serrano M. Quality improvement and extension of shelf life by 1-methylcyclopropene in plum as affected by rifening stage at harvest. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 4: 339-348 (2003)
20. Chung KH. Morphological characteristics and principal component analysis of plums. Dept. of Fruit Breeding, National Horticultural Research Institute, R.D.A., Suwon, Korea. pp. 310-440 (1999)
21. Nakatani N, kayano S, kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.) *J. Agric. Food Chem.* 48: 5512-5516 (2000)
22. Sandra AA, Demerval CL, Olga MM, Faria O. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chem.* 74: 133-137 (2001)
23. Lee TS, Cheon GJ. In vivo nuclear imaging of apoptosis. *J. Nucl. Med.* 38: 190-197 (2004)
24. Majno G, Joris I. Apoptosis oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146: 3-15 (1995)
25. Jayat C, Ratinaud MH. cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. *Biol. Cell.* 78: 15-25 (1993)
26. Nakagawa H, Yamamoto D, Kiyozuka Y, Tsuta K, Uemura Y, Hiok K, Tsutsui Y, Tsubura A. Effects of genistein and synergistic action in combination with eicosapentaenoic acid on the growth of breast cancer cell line. *J. Cancer. Res. Chin. Oncol.* 126: 448-454 (2000)
27. Kang SS, Rosemary B. Duda Effect of ginseng on the expression of onco-suppressor Gene p21 in human breast cancer cell line. *J. Korean Surg Soc.* 57: 782-788 (1999)
28. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Ni AS, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95(Fas/APO-1) death-induction signaling complex. *Cell.* 85: 817-827 (1996)
29. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease is a CrmA-inhibitible protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14486-14491 (1996)
30. Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.* 272: 7797-7800 (1997)
31. Nam HW. Effect of *Selaginella tamariscina* on apoptosis via activation of caspase-3 in HL-60. PhD thesis, Wonkwang University, Seoul, Korea (2002)

(2004년 10월 21일 접수; 2005년 2월 1일 채택)