

## 유색감자 추출물의 항돌연변이 및 항암 활성

박영은\* · 정진철\* · 조현묵\* · 황영선\*\* · 이현진\*\* · 최수산나\*\* · 이수진\*\* · 박은선\*\* · 고은아\*\*  
김난솔\*\* · 임정대\*\* · 정명근\*\*<sup>†</sup>

\*농촌진흥청 고령지농업연구소, \*\*강원대학교 생약자원개발학과

### Antimutagenic Effect and Cytotoxicity to Human Cancer Cell Lines of Colored Potato Extracts

Young-Eun Park\*, Jin-Cheol Jeong\*, Huyn-Mook Cho\*, Young-Sun Hwang\*\*, Hyeon-Jin Lee\*\*, Su-San-Na Choi\*\*, Su-Jin Lee\*\*, Eun-Sun Park\*\*, Eun-A Ko\*\*, Nan-Sol Kim\*\*, Jung-Dae Lim\*\*, and Myoung-Gun Choung\*\*<sup>†</sup>

\*National Institute of Highland Agriculture, RDA, Pyeongchang 232-955, Korea

\*\*Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

**ABSTRACT** Colored potatoes are an excellent source of dietary polyphenols including anthocyanins. Generally, anthocyanins from fruits and vegetables exhibit anti-carcinogenesis and anti-cancer properties *in vitro* test. This experiment was conducted to know the effects of colored potato extracts contained anthocyanins on antimutagenic activity and anti-cancer activity to six human cancer cell lines containing LNCaP (androgen-dependent) prostate cancer cells. Extracts of three colored potatoes ('Hongyoung', 'Jayoung' and 'Jasim') and the white potato ('Superior') cultivars were used in this study. The extracts of three colored potatoes inhibited the mutagenicities induced by direct mutagen such as 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) and another indirect mutagens of bezo(a)pyrene (BaP). Also, the extracts of 'Hoyoung' and 'Jayoung' showed higher antimutagenic activity than 'Jasim' and 'Superior' against to direct or indirect mutagen on both strains of TA98 and TA100. The activity of growth-inhibitory of extract of four potato cultivars were screened by SRB (sulphorhodamine B) method on diverse human cancer cells representing different types of cancers. Among the extract of four potato cultivars, the extract of 'Jasim' showed moderate inhibition on proliferation of LNCaP, ACHN and MOLT-4F cells and did not inhibit the proliferation of other cancer cells. On the other hand, extract of 'Superior' did not inhibit the proliferation of any tested cancer cell lines. However, the extracts of 'Hongyoung and Jayoung' inhibited the proliferation of cancer cells with GI<sub>50</sub> values ranging from 2.5 to 30 µg/mL. On the basis

of the GI<sub>50</sub> values, it is clear that LNCaP cells were more sensitive to extracts of colored potato cultivars than other cancer cells. The extract of 'Jayoung' at 30 µg/mL were more active and inhibited cell proliferation, and induced apoptosis in LNCaP cells. This result revealed that the extracts of colored potatoes are expected to be good candidate for development into source of antimutagenic and anticancer agent.

**Keywords** : colored potato, antimutagenic activity, anticancer activity, anthocyanin, Jayoung

**감자**(*Solanum tuberosum* L.)는 생육기간이 짧고, 단위면적당 생산량이 높으며 환경적응성도 비교적 강하여 세계 130여개 나라에서 재배되며, 벼, 밀, 콩, 옥수수 등과 함께 세계 주요 식량작물로 여겨지고 있다.

현재 전 세계적으로 재배되고 있는 감자의 괴경색은 백색이나 연황색이 주종을 이루지만 자연계에는 괴경 색상 형성에 관여하는 유전자의 다양성에 의해 적색 및 보라색 등 안토시아닌 색소를 함유하고 있는 다양한 색상의 유색감자도 존재한다.

괴경색이 적색 또는 보라색을 나타내는 유색감자는 다량의 안토시아닌 색소와 phenolic acid를 함유하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 미국의 경우 채소로서 소비되는 유색감자의 양은 1인당 135 파운드에 이르고 있다(Al-Saikhan *et al.*, 1995; Brown, 2005).

고등식물의 꽃, 과실, 줄기, 잎, 뿌리 등 식물체 각 부위에 폭넓게 함유되어 있는 안토시아닌 색소는 적색, 자색 및 청

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-33-570-6491  
(E-mail) cmg7004@kangwon.ac.kr

<Received November 1, 2007>

색을 나타내는 수용성 flavonoid 색소로서 식물체 부위별 특성에 따라 서로 다르게 발현되는 식물색소 이지만(Choung, 2004), 최근 인체의 만성적 질병과 연관된 항산화, 항염증, 항암, 동맥경화 억제, 지질과산화 저해 및 DNA celavage 보호 작용 등 다양한 생리활성 효과(Ramirez-Tortosa *et al.*, 2001; Acquaviva *et al.*, 2003; Lazze *et al.*, 2003; Lefevre *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2003) 가 인정되어 많은 연구자들에 의해 안토시아닌을 함유한 다양한 식품소재 개발 및 평가가 진행 중이며, 또한 안토시아닌을 이용한 질환개선 제제의 개발 및 기능성 식품으로의 활용성이 검토되고 있다.

최근 유색감자 추출물의 항산화적 특성 및 활성물질의 정량·정성분석에 대한 결과가 보고 된 바 있으며(AI-Saikhan, 2000; Nara *et al.*, 2006; Shakya *et al.*, 2006), 또한 유색감자 유래 안토시아닌의 항돌연변이, 세포증식억제, 특정 암세포의 성장저해 효과가 보고 된 바 있다(Kamei *et al.*, 1995; Bomser *et al.*, 1996, 1999; Morazzoni & Bombardelli, 1996; Nagase *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997, 1999; Pool-Zobel *et al.*, 1999; Satue-Gracia *et al.*, 1999; Tsuda *et al.*, 2000; Meiers *et al.*, 2001; Konczak-Islam *et al.*, 2003).

최근까지 몇몇 연구자들에 의해 수종의 암 세포주를 대상으로 유색감자 추출물 및 유색감자 함유 안토시아닌의 항암 활성이 검토된 바 있으나(Hagiwara *et al.*, 2002, Martin *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2005; Stoner *et al.*, 2006) 아직 인체 암 세포에 대한 세포증식 억제효과와 세포사멸 특성에 대한 정보는 극히 미흡한 실정이며, 항암활성에 대한 분자생물학적 기작의 구명도 명확하지 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 괴경 내부에 적색 및 보라색의 안토시아닌 색소를 함유한 유색감자의 추출물을 대상으로 발암성 물질에 의해 유발되는 돌연변이 저해효과와 다양한 인체 암 세포에 대한 성장저해 활성을 조사하고, 특히 유색감자 추출물이 전립선암 세포주 중 androgen receptor에 의존적인 LNCaP cell과 androgen receptor에 비의존적인 PC-3 cell에 대한 세포사멸 효과를 검토하여 유색감자를 이용한 기능성 식품 소재개발 및 유색감자의 활용성 증진을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 유색감자 추출물의 조제

본 실험에 사용된 유색감자(수미, 자심, 홍영 및 자영)는 농촌진흥청 고령지농업연구소에서 감자 표준재배법으로 재배된 감자를 사용하였다. 유색감자의 대조구로 괴경 내부가

백색을 나타내는 수미품종을 이용하였고, 괴경 내부가 보라색을 나타내는 것은 자심과 자영 품종을, 괴경 내부의 색상이 적색을 나타내는 홍영 품종을 시료로 사용하였다(Fig. 1).

각 유색 및 대조구 시료의 감자는 껍질을 제거하고, 괴경을 3 mm 수준으로 자른 후, 생체시료 100 g에 80%에탄올 1,000 mL를 첨가하여 24시간 동안 상온에서 추출한 후 여과하고, 잔류물은 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였으며, 추출된 용액은 모두 합하여 40°C 감압농축장치에서 완전히 건조하여 활성평가용 시료로 사용하였다.

### 유색감자 추출물의 Ames 돌연변이 유발 검정

돌연변이 유발에 이용된 실험균주인 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100은 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 균주로서 정기적으로 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하면서 실험에 사용하였다. 직접 돌연변이원인 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, 간접 돌연변이원인 benzo(a)pyrene[B(a)P]와 기타시약은 일본 화광순약 주식회사의 특급시약을 구입하여 사용하였으며, 이들 변이원 물질은 DMSO(Aldrich chemical Co., USA)에 녹여 실험에 사용하였다.

유색감자 추출물이 나타내는 돌연변이 유발 농도를 확인하기 위하여 예비실험(dose response 및 독성검사법, Maron & Ames, 1983)을 수행한 결과 3 mg에서 독성이 미미하게

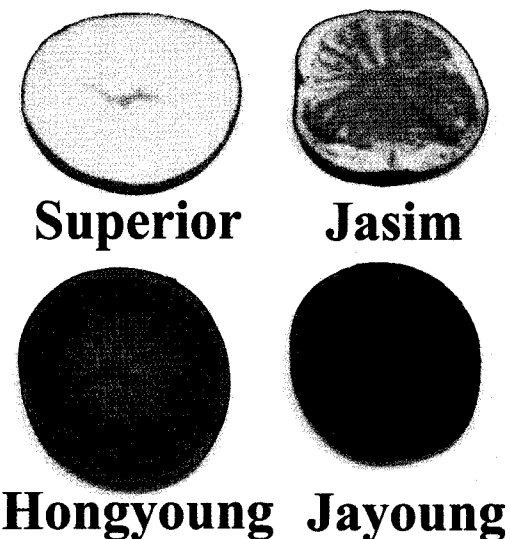


Fig. 1. The colors of tuber section in colored potatoes.

발현되었으므로, 본 실험에서의 처리농도는 유색감자 추출물 자체가 독성을 나타내지 않았던 1 mg 이하로 시료의 농도를 결정하여 실험을 수행하였다. 먼저 멸균된 cap test tube에 top agar 2 mL를 분주한 후, 균주 100  $\mu$ L( $1\sim 2\times 10^9$  cells/mL)와 시료를 첨가하고 가볍게 vortex한 후 nutrient agar plate에 분주하고 고화시킨 후 37°C에서 24시간 배양시킨 다음 독성유무를 판정하였다.

돌연변이원성 실험에 사용한 *Salmonella typhimurium*의 histidine 영양요구성 변이주는 TA98 및 TA100 두 종류를 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation mutagenicity test를 이용하였다(Matsushima *et al*, 1985). 유색감자 추출물을 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50  $\mu$ L씩 첨가하고 여기에 미리 TA culture배지(Difco nutrient broth 0.8 g + NaCl 0.5 g + 증류수 100 mL)에서 하룻밤 배양된 균주 100  $\mu$ L를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 전체량이 700  $\mu$ L가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 30분간 예비 배양하였고, histidine/biotin이 첨가된 45°C의 top agar를 2 mL씩 각 tube에 넣고 3초간 vortex 하였고, minimal glucose agar plate상에 도말한 후 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양한 후 발생된 복귀 돌연변이(his<sup>+</sup> revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 한편 간접변이원의 대사활성화를 위한 S-9 mixture는 Sprague-Dawley male rat에 aroclor 1245를 복강주사한 후 5일째 4°C 무균상태에서 간을 적출하여 0.15 M KCl(3 mL/g liver)과 함께 homogenizer로 균질화한 후 9,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상징액(S-9 fraction) 2 mL에 MgCl<sub>2</sub>-KCl salts 1 mL, 1 M glucose-6-phosphate 0.25 mL, 0.1 M NADP 2 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 25 mL 및 멸균수 19.75 mL를 첨가하여 조제하였다(Maron & Ames, 1983).

### 유색감자 추출물의 항돌연변이 활성 검정

유색감자 추출물의 항돌연변이 실험에 사용된 발암물질은 4NQO와 B(a)P를 사용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 유색감자 추출물을 각각 50  $\mu$ L씩 첨가하였고, 대사활성물질로서 Ames 돌연변이 유발 검정실험에서 미리 제조한 S-9 mixture를 250  $\mu$ L씩 각각 첨가하였다. 여기에 하룻밤 배양된 균주를 100  $\mu$ L씩 주입한 후, 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700  $\mu$ L가 되도록 조제하였다. 그 후 20분간 preincubation한 다음 histidine/biotin이 첨가된 45°C의 top agar를 2 mL씩 각 tube에 붓고

3초간 vortex한 후 minimal glucose agar plate상에 도말한 뒤 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이(his<sup>+</sup> revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하고 돌연변이 억제효과의 정도(Inhibition rate)를 아래의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = 100 \times \{(a-b)/(a-c)\}$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수이다.

### 유색감자 추출물의 항암활성

유색감자 추출물의 인체 암세포주에 대한 세포생육억제 효과를 SRB(Sulfo Rhodamine B)법으로 조사하였다. 암세포주는 전립선암세포주인 LNCaP, 결장암 세포주인 HCT-15와 SW-620, 신장암 세포주인 ACHN, 폐암 세포주인 A549, 백혈병 세포주인 MOLT-4F를 사용하였다. 유색감자 추출물의 정상세포에 대한 독성 여부를 확인하기 위하여 간세포주인 293(human embryo liver)을 Korea Cell Line Bank (KCLB)로부터 구입하여 대조구로 사용하였다. 상기 암세포주는 10% 소 태아 혈청이 포함된 RPMI 1640배지를 사용하여 배양하였고, 배양된 세포는 일주일에 한번 또는 두 번 정도 분주하여 유지하였다.

유색감자 추출물의 항암활성을 측정하는데 사용된 세포의 농도는 1 mL 당 3,000-6,000개였으며, 상기 방법에 사용된 모든 시약은 100% DMSO에 용해시키고, 이를 단계적으로 희석하여 유색감자 추출물의 시료 농도를 30, 10, 5, 2.5, 1, 0.1  $\mu$ g/mL로 조제하였다. 각 처리별 세포의 수를 측정하여 일정한 농도로 96-well plate에 분주한 후 하루가 경과한 다음 세포가 나타내는 기본적인 흡광도를 측정하기 위해 Tz plate에 시료를 옮긴 후 50% TCA를 사용하여 세포의 생장을 고정하고 시료를 첨가하지 않은 대조구로 사용하였고, 농도별 시료 고유의 흡광도를 측정하기 위해 동일한 세포농도를 가진 또 다른 Tz plate에 농도별 시료를 처리한 후 시료 첨가 대조구로 사용하였다. 대조구 흡광도 측정을 위해 만들어진 Tz plate는 1시간이 경과하면 수돗물로 세척하였고, 시료를 처리한 plate는 2일이 경과한 다음 50% TCA를 well당 50  $\mu$ L씩 처리하여 생장을 고정하고 역시 1시간이 경과하면 수돗물로 세척하였다. 세척한 plate는 상온에서

건조하고, 그 후 0.4% SRB 용액을 well 당 100  $\mu$ L씩 가한 다음 30분이 경과하면 1% 아세트산 용액으로 세척하였고, 이를 다시 상온에서 건조 시켰다. 그 후 10 mM Tris 염기 (pH: 10.5)를 well 당 100  $\mu$ L씩 가하여 다시 용해시키고, ELISA 해독기를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 암세포의 성장을 50% 억제하는 화합물의 농도를 GI<sub>50</sub>( $\mu$ g/mL)으로 나타내었고, 대조군으로 임상적 암치료에 사용되는 합성 항암제인 adriamycin을 사용하였다.

### 전립선암 세포주의 DNA 분절 검정

일반적으로 LNCaP cells과 PC-3 cells은 전립선암에 대한 활성물질의 항암효과를 검사하는데 광범위하게 사용되는 세포주이다. LNCaP cell line은 인간 전립선 선암의 전이단계로부터 얻을 수 있으며, 세포질에 있는 전립선암 발생에 결정적인 역할을 하는 androgen receptor와 매우 높은 친화성을 가진 세포주이고 세포치사가 일어나는 동안에 ROS (reactive oxygen species)의 생성을 조절하고 caspase-3를 활성화 시키며 poly(ADP-ribose) polymerase[PARP]의 해리를 유도하여 세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다. 전립선암 세포주 중 androgen에 의존적인 PC-3 cell과 androgen 비 의존적인 LNCaP cell을 대상으로 하여 유색감자 추출물의 첨가에 따른 세포사멸 시 나타나는 DNA 분절현상을 enzyme-linked immunosorbent assay kit(Cell Death Detection ELISA; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)를 사용하여 검정하였다.

48-well plate에 각 세포주를 접종하고  $2.5 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 세포를 초기배양한 후에 유색감자 추출물을 5와 10  $\mu$ g/mL 수준으로 첨가하고 24시간 동안 다시 배양하였다. 배양된 세포는 5배의 차가운 균질화 완충액(50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, pH 7.8)을 첨가하여 Teflon homogenizer로 균질화 한 후 750  $\times$  g에서 10분 동안 원심분리 하였다. Kit에 포함된 incubation buffer로 cell을  $1 \times 10^4$  cells/mL로 희석한 후에 kit 내에 제공된 방법에 따라 ELISA를 사용하여 측정하였다. Apoptosis와 구별되는 necrosis 비율을 산출하기 위하여 LDH cytotoxicity detection kit(Takara Bio Inc. Shiga, Japan)를 사용하여 세포독성을 측정하였다.

### TUNEL Assay에 의한 apoptosis 유발 확인

유색감자 추출물 중 전립선암 세포주 LNCaP에 대해 높은 활성을 나타내었던 자영 품종의 추출물을 이용하여 전립선암 세포주인 LNCaP와 PC-3 세포주를 대상으로 세포사멸 유발여부를 확인하기 위하여 *in situ* DNA fragmentation 검출

이 가능한 TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) technique을 사용한 *in situ* cell death detection POD kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하였다. Cell의 농도를 조절하여( $4 \times 10^4$ ) glass slide에 위치시켜 유색감자 추출물을 처리하고 12시간 이후에 kit에 제공된 방법으로 파라핀을 이용해 세포를 고정한 후 파라핀 슬라이드를 60°C oven에 20분 가열한 다음 표준 방법으로 파라핀을 제거하고 함수시켰다. 조직 표본을 proteinase K(20  $\mu$ g/mL in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)로 37°C에서 30분간 배양하였고, 수차례 PBS로 세척한 후 endogenous peroxidase 활성을 억제하기 위하여 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol 용액으로 37°C 배양기에 30분간 처리하였다. 이후 TdT, reaction buffer 등 TUNEL reaction mixture를 조직에 작용시켜 37°C 배양기에 60분간 방치하였고, PBS로 3회 세척한 다음 Converter-POD를 처리하여 37°C 배양기에 30분간 반응시켰다. 반응 종결 후 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)-substrate 용액으로 12분간 발색시키고, 알콜 및 xylene에 차례로 침적시켜 커버글라스에 고정한 후 80 kV의 전자현미경(Hitachi H-7100, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 세포사멸이 유발된 cells의 비율은 발색된 판을 1 field당 50개의 세포가 들어가도록 12개의 filed로 나누고 염색된 세포의 수를 세어 계산하였다.

### Western Blot Analysis

유색감자 추출물 중 전립선암 세포주 LNCaP에 대해 높은 활성을 나타내었던 홍영 및 자영 품종의 추출물을 이용하여 LNCaP와 PC-3 세포주를 대상으로 apoptosis와 관련된 유전자의 발현 여부를 확인하였다. LNCaP와 PC-3 세포주를 2.5% charcoal- stripped FBS를 포함한 DMEM F-12 배지에서 세포밀도가  $1.5 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 24시간동안 배양한 후 세포에 DMSO와 유색감자 추출물을 10  $\mu$ g/mL 수준으로 첨가하고 24시간과 48시간으로 나누어 배양하였다. 배양된 각 세포에서 단백질을 추출하기 위하여 1% proteinase inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich)을 함유한 radioimmunoassay(RIPA) buffer(50 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.05% SDS 및 1% sodium deoxycholate, Ohnishi *et al.*, 1996)를 첨가한 후 혼합물을 원심분리(12,000  $\times$  g, 4°C 조건, 10분)하였고, 각 과정을 2회 반복하였으며, 추출된 단백질의 정량은 Lowry 등 (1951)에 의한 방법으로 수행하였다.

PARP 단백질의 발현을 확인하기 위해서 7.5% poly-

acrylamide gel에서, Bax와 caspase 단백질의 발현은 12% polyacrylamide gel에서 분석하였다. 각 시료를 100℃에서 3분간 끓인 후 PARP 단백질의 immunoblotting에서는 lane 당 40 µg을, Bax와 caspase 단백질의 immunoblotting에서는 lane 당 30 µg을 사용하여 전기영동을 수행 하였다. SDS-PAGE는 120 V에서 4시간 전개하였으며, 0.2 µm PVDF membrane(Polyvinylidene difluoride, BioRad, CA)에 transfer하였고 각 membrane을 5% milk가 포함된 TBST buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에서 30분 동안 blocking 한 후 5% milk를 포함한 TBST buffer에 primary antibody를 첨가하고 4℃에서 24시간 동안 incubation 하였으며, 다시 5% milk를 포함한 TBST buffer에 secondary antibody를 첨가하고 90분 동안 반응시켰다. PARP 단백질은 primary antibody로 anti-PARP(C-2-10, IgG1, 0.05 mL, Sigma, USA)를 1:2,000으로 희석하여 사용하였으며, Bax 단백질은 anti-Bax(IgG2b, 200 µg/1 mL, Santa Cruz, USA)를, caspase 단백질은 Cleaved Caspase Antibody Sampler Kit # 9929(40 µL × 6, Biolabs Ltd, England) monoclonal antibody를 각각 1:500으로 희석하여 사용하였다. Second antibody는 antimouse IgG-HRP(200 µg/1 mL, Santa Cruz, USA)를 1:1,000으로 희석하여 사용하였다. Immunoreactive band를 확인하기 위하여 peroxidase BMB(BM blue POD substrate precipitating, Roche, Germany)를 첨가하였으며, densitometer(GC-710, Bio-Rad, USA)를 사용하여 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**유색감자 추출물의 항돌연변이 활성 검증**

감자 추출물의 항돌연변이 활성을 검증하기 위해 유색감

자의 대조구로 괴경 내부가 백색인 수미품종을 사용하고, 유색감자로서 괴경 내부가 적색인 홍영, 괴경 내부가 보라색인 자심과 자영 품종으로 구분하여 각 감자의 추출물을 얻고, 추출물의 항돌연변이 활성을 검토하였다.

Ames test를 실시한 결과 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98이 13±3, TA100은 192±8이었다. 각 유색감자 에탄올 추출물 자체의 돌연변이원성을 실험한 결과, 집락수가 음성대조군에 비하여 농도 의존성을 나타내지 않으므로 돌연변이원성을 나타내지 않는 것으로 조사되었다.

강력한 발암물질이며 직접 돌연변이원인 4NQO(0.15 µg/plate)를 *S. typhimurium* TA98 균주에 처리하여 유도된 돌연변이로부터 각 유색 감자 추출물의 시료농도를 200 µg/plate로 첨가하였을 때 홍영과 자영은 각각 83%, 85%로 가장 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었다. 또한 TA100 균주의 경우에서도 홍영과 자영이 각각 69%, 75%로 가장 높은 억제 효과를 나타내었으며, 괴경 내부가 백색인 수미품종의 경우 TA98과 TA100 균주에서 각각 43%, 38% 수준이었으며, 자심의 경우도 각각 44%, 51% 수준으로 홍영 및 자영 품종에 비해 낮은 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

한편, 간접변이원이며 실제로 식품을 통해 흡수될 수 있는 polycyclic aromatic hydrocarbon인 B(a)P를 사용한 실험에서 TA98 균주에서는 홍영과 자영이 각각 84%, 75%로 가장 높은 돌연변이 유발 억제효과를 보였으며, TA100 균주에서도 67%와 70%로 홍영 및 자영 품종이 가장 높은 억제효과를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 홍영 및 자영 품종이 괴경색이 백색인 수미품종이나 괴경색이 옅은 보라색을 나타내는 자심보다 더 많은 양의 안토시아닌을 함유하기 때문에 더 강한 억제효과를 나타내는 것으로 판단되며, 실제 자색고구마를 대상으로 한 선행연구에서도 cyanidin계열의 안토시아닌인 cyanidin 3-(6,6'-caffeylferulyl sophoroside)-

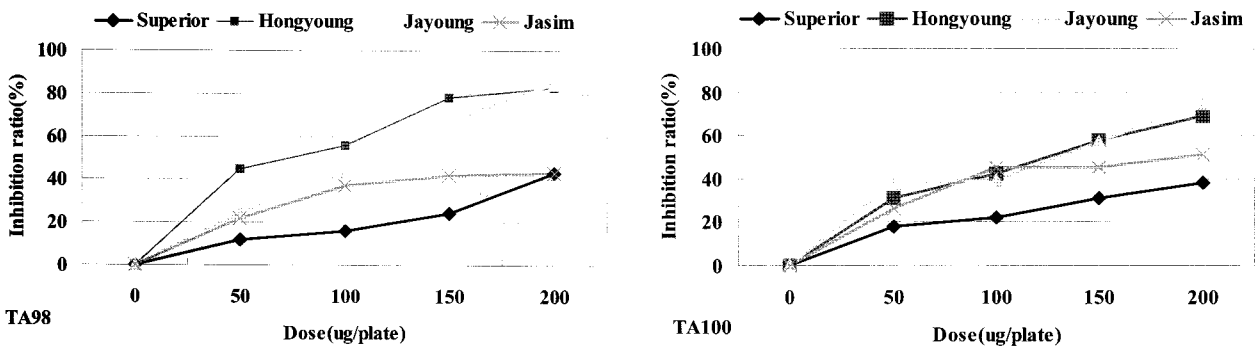


Fig. 2. The antimutagenic effects of colored potato extracts against 4NQO (0.15 µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

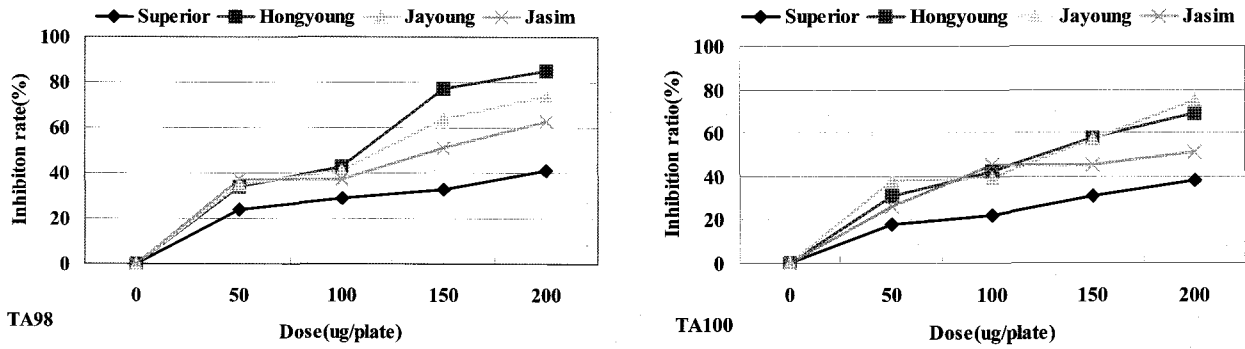


Fig. 3. The antimutagenic effects of colored potato extracts against B(a)P (10 µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

5-glucoside가 강력한 항돌연변이 활성을 나타낸다는 결과가 보고(Yoshimoto *et al.*, 2001)된 바 있으므로, 유색감자 중 홍영 및 자영 품종이 다른 품종에 비해 더 강한 돌연변이 억제효과를 나타내는 것은 함유된 안토시아닌이 더욱 많은 것에 유래한 것으로 판단된다.

**유색감자 추출물의 항암활성 비교**

유색감자의 추출물의 인체 암세포주에 대한 세포생육억제 효과를 SRB법으로 검정한 결과는 Table 1과 같다. 다양한 인체 암세포주(LNCaP: 전립선암, HCT-15: 결장암, ACHN: 신장암, SW620: 결장암, A549: 폐암, MOLT-4F: 백혈병)를 대상으로 세포독성을 실험한 결과, 폐암 세포주인 A549세포 및 결장암 세포주인 HCT-15에서는 실험에 이용된 모든 감자 추출물이 활성을 나타내지 않은 반면, 전립선암 세포주인 LNCaP에 대해서는 괴경색이 백색인 수미품종이 30 µg/mL 이상을 나타내어 활성을 나타내지 않았으나, 괴경에 안토시아닌이 함유되어 있는 유색감자인 홍영, 자영 및 자심 품종은 각각 2.5 µg/mL, 2.5 µg/mL 및 10 µg/mL으로 우수한 세포독성 효과를 나타내었으며, 이 밖에도 유색감자 추출물은 결장암(SW-620), 신장암(ACHN), 백혈병(MOLT-4F) 세포주에 대해서도 약한 활성을 나타내었고, 공시된 유

색감자 중 자영이 다양한 암세포주에 대하여 가장 높은 항암활성을 나타내는 것으로 평가되었다.

한편 유색감자 추출물이 정상 간세포주인 293에 대해 독성을 나타내는가를 확인하기 위해 각 유색감자 추출물 시료의 농도를 100 µg/mL로 조제하고 상기 공시된 모든 인체 암세포주에 처리한 결과 60% 전후의 억제율을 나타낸 반면, 정상 간세포주인 293에서는 2% 이하의 생육 억제율을 나타내었다. 이는 감자 추출물이 암세포주에 대해서는 높은 생육억제 효과를 나타내지만 정상세포에 대해서는 억제효과가 거의 없는 것으로 나타나 유색감자 추출물이 세포에 대한 안전성이 있음을 시사한다고 하겠다.

최근 Adeyemo 등(2001)의 연구에 의하면 결장암에 대한 길항대사치료제인 5-Fluorouracil(5-Fu) 투여 시 암세포뿐만 아니라 소장의 상피세포와 같이 급속하게 성장하는 정상세포도 손상되는 부작용이 나타나며, 이를 막기 위하여 안토시아닌이 함유된 추출물(50 µg/mL 이상)을 병용 처리할 경우 암세포의 성장억제 효율이 30% 상승될 뿐만 아니라 정상세포에 대한 부작용도 억제된다고 보고한 바 있다. 본 실험의 결과 유색감자의 추출물이 결장암 세포인 HCT-15 cell에 대해서는 활성을 나타내지 않았으나, 동일 결장암 세포인 SW-620에서는 활성이 나타나는 것은 유색감자 추출

Table 1. Cytotoxic activities of colored potato extracts against human cancer cell lines.

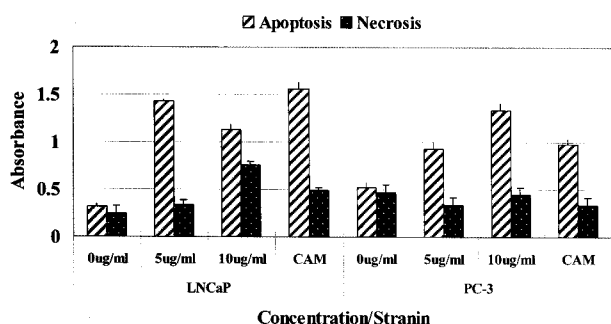
Colored potato	GI <sub>50</sub> (µg/mL)					
	LNCaP	HCT-15	ACHN	SW-620	A549	MOLT-4F
Superior	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	30
Hongyoung	2.5	> 30	30	10	> 30	10
Jayoung	2.5	> 30	10	10	> 30	10
Jasim	10	> 30	10	30	> 30	10
Adriamycin	0.13	0.16	0.13	< 0.03	< 0.03	0.05

물에 함유된 활성성분에 특이적으로 반응하는 세포주가 있음을 시사하는 것이며, 품종별 유색감자 추출물이 서로 다른 항암활성을 나타내는 것은 그들이 함유하고 있는 안토시아닌의 농도에 기인하는 것으로 판단된다. 또한 안토시아닌이 함유된 유색감자 추출물은 특정 암세포주에 대한 항암활성은 높고 정상세포의 성장에는 영향을 미치지 않으므로 안토시아닌이 다량 함유된 유색감자 추출물은 기존 항암제의 안정성 확보를 위한 병용처리제 및 치료효율을 높일 수 있는 상승 처리제로 활용되어질 수 있음을 시사한다고 하겠다.

### 유색감자 추출물 첨가에 따른 전립선암 세포주의 세포사멸 유발효과 검증

유색감자는 괴경과 껍질에 안토시아닌을 함유하고 있어 적색 및 보라색의 색상을 나타내는데, 이들 안토시아닌은 암세포에 대한 세포사멸을 유발할 수 있으며 cell cycle arrest에 관계되는 유전자의 발현을 유도시킨다고 보고되고 있고(Katsube *et al.*, 2003), 안토시아닌의 비당체 중 하나인 cyanidin과 delphinidin은 암세포 관련 유전자의 발현에 중요한 epidermal growth factor receptor를 잠재적으로 저해하여 암세포의 증식 및 전이에 관여하는 signal cascade의 downstream 폐쇄에 관여한다는 보고도 있다(Meiers *et al.*, 2001).

유색감자 추출물 중 전립선암 세포주인 LNCaP에 대해 높은 항암활성을 나타내었던 자영 품종의 추출물은 LNCaP 세포의 증식을 저해하였으며, 5-10 µg/mL의 농도에서 72시간 이후에 세포가 치사에 이르는 것을 관찰할 수 있었다.



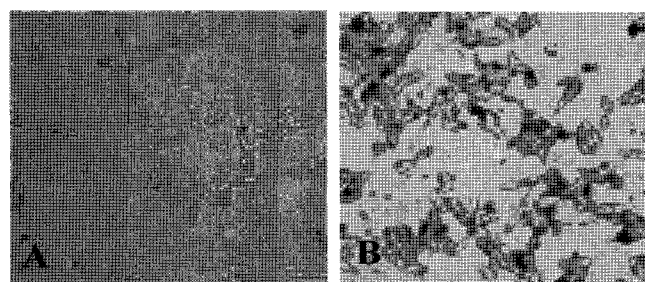
**Fig. 4.** Induction of apoptosis by colored potato extract (Jayoung cultivar) in LNCaP and PC-3 cells using a cell-death ELISA kit. LNCaP and PC-3 cells were treated with colored potato extract at 5, 10 µg/mL and camptothecin at 5 µM for 24 h. Absorbance is a measure of apoptosis (Cell death detection ELISA kit) and necrosis (LDH assay). Results are presented as means±SD of three independent experiments.

Cell death detection ELISA kit을 이용하여 자영 추출물을 전립선암 세포주에 처리한 후 효과를 살펴본 결과 처리하지 않은 세포에 비해 LNCaP와 PC-3 세포주 모두에서 세포사멸 효과가 유발되는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 4), 세포사멸 유도제로 사용되는 camptothecin(CAM) 처리군과 유사한 세포사멸 반응을 나타내었다.

현재까지의 선행연구에 의하면 안토시아닌은 많은 암세포주의 치사를 유도할 수 있는 활성을 가지고 있으며, 이것은 caspase-dependent apoptosis와 연관되어 있음이 보고되어지고 있으므로(Lazze *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Fimognari *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2005; Yeh & Yen, 2005) 자영 품종의 추출물에 포함된 암세포사멸 유발 활성물질은 안토시아닌과 그 유도체에 기인하는 것으로 생각되어진다.

또한 전립선암 세포주인 LNCaP에 유색감자인 자영 품종의 추출물을 처리하였을 때 세포사멸 유발 여부를 TUNEL assay를 통하여 확인한 결과, 추출물을 5 µg/mL의 농도로 처리한 경우 전립선암 세포주 LNCaP의 핵이 나뉘어 지고, DNA가 분절 되는 것을 갈색 점으로 확인할 수 있었다(Fig. 5).

한편 자영 추출물을 LNCaP 세포주에 5 µg/mL 수준으로 첨가하여 apoptosis 유발 효과를 검증한 결과 caspase 효소 발현을 활성화 시켜 caspase-dependent PARP cleavage를 유발하고, 12시간, 18시간, 24시간으로 시간이 경과함에 따라 cleaved PARP, cleaved caspase 3, 그리고 cleaved caspase 9 protein의 유전자 발현이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 자영 추출물을 첨가함에 따라 전립선암 세포주인 LNCaP에서 Bax protein의 발현 수준도 증가하였는데(Fig. 6), 이 결과는 유색감자인 자영 품종의 추출물에 함유된 성분들이 LNCaP 세포의 apoptosis를 유발시키는 활성을 가지고 있다는 것을 의미하는 것이며, 안토시아닌 중 delphinidin이 간암 세포주에서 Bax protein의 발현을 유도하였다는 선



**Fig. 5.** TUNEL assay for apoptosis under light microscope after adding POD and DAB substrate in LNCaP cells. A, DMSO treatment; B, treatments of Jayoung extracts.

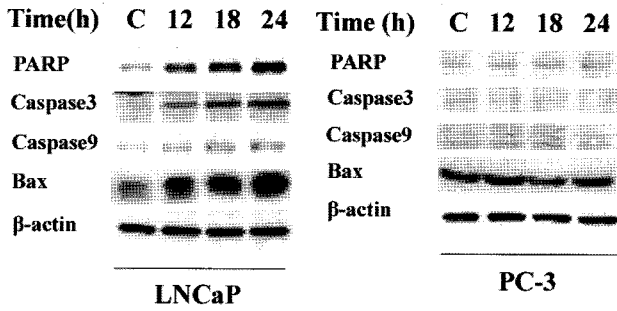


Fig. 6. Modulation of apoptotic proteins by Jayoung extract in LNCaP and PC-3 cells.

행 보고와도 일치하는 결과이다(Yeh & Yen, 2005).

반면 PC-3 cell에서는 자영 품종의 추출물이 cleaved PARP, cleaved caspase 3, cleaved caspase 9 proteins 및 Bax protein의 발현 수준에 큰 영향을 미치지 못하였다. 이 결과는 자영 품종의 추출물에 함유된 안토시아닌을 포함하는 활성 물질이 LNCaP 세포주와 PC-3 세포주에서 서로 다른 대사 기작에 의해 내재적인 apoptosis pathway를 유도하는 것으로 생각된다. Caspase-dependent(LNCaP) 세포주와 caspase-independent(PC-3)에서 유색감자인 자영 추출물의 처리에 따라 서로 다른 apoptosis 유전자 발현 양상을 나타내고 있는 것은 자영 품종의 추출물이 PC-3 세포주에서는 보편적인 세포 치사에만 관여하는 반면 LNCaP 세포주에서는 보편적인 세포 치사는 물론 caspase-dependent한 pathway를 통해 세포의 사멸을 유발 시키는 것으로 생각된다. 따라서 유색감자의 추출물 중 어떤 활성성분이 이러한 반응을 유도하며, 어떠한 메커니즘을 가지는지는 더욱 체계적으로 구명할 필요성이 있을 것이며, 저자들은 현재 자영 품종을 대상으로 전립선암 세포주인 LNCaP의 세포사멸을 유발하는 원인 물질의 구명을 위해 물질 분리 정제를 진행 중이고, 추후 다양한 암세포주에 대한 항암활성의 상관관계와 활성 메커니즘 구명을 위한 연구를 계속적으로 수행할 계획이다.

적 요

본 연구는 괴경 내부에 적색 및 보라색의 안토시아닌 색소를 함유한 유색감자의 추출물을 대상으로 *S. typhimurium* TA98과 TA100 균주의 돌연변이 유발여부를 확인하였고, 직접돌연변이원인 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)와 간접돌연변이원인 bezo(a)pyrene(BaP)에 의해 유발될 수 있는 돌연변이에 대한 항돌연변이 활성과 6종의 인간 암세포주(전립선암세포주: LNCaP, 결장암 세포주: HCT-15와 SW-

620, 위암 세포주: ACHN, 폐암 세포주: A549, 백혈병 세포주: MOLT-4F)를 대상으로 SRB 방법을 이용하여 항암활성을 비교하였다. 그 결과 유색감자 중 괴경 내부에 보라색의 안토시아닌을 다량 함유한 자영 품종이 다른 품종에 비해 높은 수준의 항돌연변이활성 및 항암활성을 나타내었으며, 특히 자영 품종의 추출물은 다른 세포주 보다 전립선암 세포주에 대한 항암활성이 특이적으로 우수한 양상을 확인하였다. 자영 품종의 추출물은 5 µg/mL 이상의 농도에서 암세포의 증식을 억제할 뿐 아니라, 전립선암 세포주 LNCaP와 PC-3에 대해 세포사멸을 유발하는 결과를 Cell Death Detection ELISA와 TUNEL Assay로 확인하였고, 세포사멸과 연관된 유전자의 발현분석을 western blot으로 확인하였다. 이상의 결과에서 괴경 내부에 안토시아닌을 함유한 유색감자는 괴경 내부의 색상이 백색인 일반감자에 비해 강한 항돌연변이활성 및 항암활성을 나타내므로 유색감자는 기능성이 증대된 식용감자로서의 이용가치가 충분하며, 유색감자를 이용한 기능성식품 소재개발 및 의료산업의 신규 소재화가 가능하리라 판단된다.

사 사

이 연구는 농촌진흥청 국책기술개발사업(200802A01030011호)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

Acquaviva, R., A. Russo, and F. Galvano. 2003. Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol. Toxicol.* 19(4) : 243-252.

Adeyemo, D., F. Imtiaz, S. Toffa, M. Lowdell, R. G. Wickremasinghe and M. Winslet. 2001. Antioxidants enhance the susceptibility of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil by augmenting the induction of the bax protein. *Cancer Lett.* 164(1) : 77-84.

Al-Saikhan, M. S. 2000. Antioxidants, proteins, and carotenoids in potato (*Solanum tuberosum*, L.) Department of Horticultural Sciences. Texas A&M University, College Station, Ph. D. Thesis

Bomser, J., D. L. Madhavi, K. Singletary, and M. A. Smith. 1996. *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med* 62 : 212-216.

Bomser, J. A., K. W. Singletary, M. A. Wallig, and M. A. Smith. 1999. Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds. *Cancer Lett.* 135 : 151-157.

Brown, C. R. 2005. Antioxidants in Potato. *Amer. J. Potato*



- Res., 82 : 163-172.
- Chang, Y. C., H. P. Huang, J. D. Hsu, S. F. Yang, and C. J. Wang. 2005. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 205 : 201-212.
- Chen, P. N., S. C. Chu, H. L. Chiou, C. L. Chiang, S. F. Yang, and Y. S. Hsieh. 2005. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. *Nutr. Cancer*, 53 : 232-243.
- Choung, M. G. 2004. Analysis of anthocyanins. *Korean J. Crop Sci.* 49(S): 55-67.
- Fimognari, C., F. Berti, M. Nusse, G. Cantelli Forti, and P. Hrelia. 2005. *In vitro* antitumor activity of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Chemotherapy*, 51 : 332-335.
- Hagiwara, A., H. Yoshino, T. Ichihara, M. Kawabe, S. Tamano, H. Aoki, T. Koda, M. Nakamura, K. Imaida, N. Ito, and T. Shirai. 2002. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *J. Toxicol. Sci.* 27 : 57-68.
- Kamei, H., T. Kojima, M. Hasegawa, T. Koide, T. Umeda, T. Yukawa, and K. Terabe. 1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. *Cancer Invest.* 13 : 590-594.
- Katsube, N., K. Iwashita, T. Tsushida, K. Yamaki, and M. Kobori. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 51(1) : 68-75.
- Konczak-Islam, I., M. Yoshimoto, D. Hou, N. Terahara, and O. Yamakawa. 2003. Potential chemopreventive properties of anthocyanin-rich aqueous extracts from *in vitro* produced tissue of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51(20) : 5916-5922.
- Lazze, M., R. Pizzala, M. Savio, L. Stivala, E. Prosperi, and L. Bianchi. 2003. Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutat Res.* 53(1) : 103-115.
- Lazze, M. C., M. Savio, R. Pizzala, O. Cazzalini, P. Perucca, A. I. Scovassi, L. A. Stivala, and L. Bianchi. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*, 25 : 1427-1433.
- Lefevre, M., L. Howard, M. Most, Z. Ju, and J. Delany. 2004. Microarray analysis of the effects of grape anthocyanins on hepatic gene expression in mice. *FASEB J.* 18 : 851.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Revised method for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113 : 173-215.
- Martin, S., L. Favot, R. Matz, C. Lugnier, and R. Andriant-sitohaina. 2003. Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/2. *Biochem. Pharmacol.* 65 : 669-675.
- Matsushima, T., M. Maramatsu, and M. Haresaku. 1985. Mutation tests on *Salmonella typhimurium* by the preincubation method. *Prog. Mut. Res.* 5 : 181-186.
- Meiers, S., M. Kemeny, U. Weyand, R. Gastpar, E. von Angerer, and D. Marko. 2001. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J. Agric. Food Chem.* 49(2) : 958-962.
- Morazzoni, P. and E. Bombardelli. 1996. *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia* 67 : 3-29.
- Nagase, H., K. H. Sasaki, A. Kito, and T. Sato. 1998. Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness *in vitro*. *Planta Med.* 64 : 216-219.
- Nara, K., T. Miyoshi, T. Honma, and H. Koga. 2006. Antioxidative activity of bound form phenolics in potato peel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 : 1489-1491.
- Pool-Zobel, B. L., A. Bub, N. Schroder, and G. Rechkemmer. 1999. Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur. J. Nutr.* 38 : 227-234.
- Ramirez-Tortosa, C., O. Andersen, and P. Gardner. 2001. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic. Biol. Med.* 31(9) : 1033-1037.
- Rossi, A., I. Serraino, and P. Dugo. 2003. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radic. Res.* 37(8) : 891-900.
- Satue-Gracia, M. T., C. Andres-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventos, and E. N. Frankel. 1999. Spanish sparkling wines (Cavas) as inhibitors of *in vitro* human low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 2198-2202.
- Shakya, R. and D. A. Navarre. 2006. Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 54 : 5253-5260.
- Shih, P. H., C. T. Yeh, and G. C. Yen. 2005. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.*, 43 : 1557-1566.
- Stoner, G. D., T. Chen, L. A. Kresty, R. M. Aziz, T. Reine-mann, and R. Nines. 2006. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms. *Nutr. Cancer*, 54 : 33-46.
- Tsuda, T., F. Horio, and T. Osawa. 2000. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *Biofactors* 13 : 133-139.
- Wang, H., G. Cao, and R. L. Prior. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 304-309.

- Wang, H., M. G. Nair, G. M. Strasburg, Y. C. Chang, A. M. Booren, J. I. Gray, and D. L. De Witt. 1999. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J. Nat. Prod.* 62 : 294-296.
- Yeh, C. T. and G .C. Yen. 2005. Induction of apoptosis by the Anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53 : 1740-1749.
- Yi, W., J. Fischer, and C. C. Akoh. 2005. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 53 : 8804-8812.
- Yoshimoto, M., S. Okuno, M. Yamaguchi, and O. Yamakawa. 2001. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato, *Biosci. Biot. Biochem.* 65(7) : 1652-1655.