

## 유자와 탕자 과피 에탄올 추출물의 MCF-7 유방암 세포에 대한 항암 활성

김지은<sup>1</sup> · 박준희<sup>2</sup> · 강병원<sup>3</sup> · 서민정<sup>1</sup> · 최영현<sup>4</sup> · 임학섭<sup>5</sup> · 서권일<sup>6</sup> · 김정인<sup>7</sup> · 주우홍<sup>8</sup> · 이복규<sup>2</sup> · 정영기<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>2</sup>동의대학교 분자생물학과, <sup>3</sup>동아대학교 BK21 실버바이오 사업단, <sup>4</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>5</sup>(주)천년약속 바이오연구소, <sup>6</sup>순천대학교 식품영양학과, <sup>7</sup>인제대학교 식품생명과학부, <sup>8</sup>창원대학교 생물학과

Received September 2, 2008 / Accepted October 22, 2008

**Anticancer Activity of Ethanol Extract from Peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on MCF-7 Breast Cancer Cells.** Ji Eun Kim<sup>1</sup>, Joon Hee Park<sup>2</sup>, Byoung Won Kang<sup>3</sup>, Min Jeong Seo<sup>1</sup>, Yung Hyun Choi<sup>4</sup>, Hak Seob Lim<sup>5</sup>, Kwon Il Seo<sup>6</sup>, Jeong In Kim<sup>7</sup>, Woo Hong Joo<sup>8</sup>, Bok Kyu Lee<sup>2</sup> and Yong Kee Jeong<sup>1,5\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, <sup>3</sup>BK21 Center for Silver-Bio industrialization Project, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>4</sup>Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan 614-052, Korea, <sup>5</sup>Department Bioinstitute, MILLENNIUM PROMISE CO., LTD., Gijang-gun, Busan 619-962, Korea, <sup>6</sup>Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, <sup>7</sup>School of Food and Life Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea, <sup>8</sup>Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea - In this study, anti-cancer activities of peel of *Citrus junos* (CJP) and *Poncirus trifoliata* (PTP) on MCF-7 breast cancer cells, and anti-proliferative effects of cancer cells induced by environmental hormones were investigated. The ethanol extracts of CJP and PTP inhibited cancer cell growth and induced apoptosis at the concentration over 300 mg/ml treatment for 72 hr. Morphological change of MCF-7 breast cancer cells were observed treated with the CJP and PTP of 500 mg/ml concentration for 72 hr, and apoptosis was induced by activation of caspase-3. The proliferation of MCF-7 breast cancer cells was decreased in a dose-dependent manner treated with various concentration of CJP and PTP, when compared with the control at 300 mg/ml, the proliferation of the MCF-7 breast cancer cells of both extracts was decreased over 70% and 80%, respectively.

**Key words :** *Poncirus trifoliata*, *Citrus junos*, MCF-7 breast cancer cell, anti-cancer activity, anti-proliferative effect

### 서 론

탕자(*Poncirus trifoliata*)는 다른 감귤류 보다 내한성이 강하여 경기이남 지역까지 생육이 가능하며, 촌락부근에 흔히 울타리용으로 심고 있는 귀화 식물로서 과실은 성숙하면서 황색으로 착색되고 특유의 강한 향기와 신맛을 가지며 생식에는 부적합하여 민간요법 및 한방에서 방향고미건위제로 널리 이용되었다. 최근 탕자에 관한 연구로는 병원성 세균에 대한 탕자즙의 항균효과와 limonene, myrcene,  $\beta$ -caryophyllene, trans- $\beta$ -ocimene,  $\beta$ -pinene, 3-thujene, 7-geranyloxy coumarin 등 탕자의 향기 성분과 관련한 연구, "지실과 지각"에서 flavonoid glycoside의 분리 및 과피와 과육에서의 성분 등 주로 이화학적 연구와 함염증, 향과민증, 항유해장내세균, 멜라닌 생성억제 등의 기능이 확인되었다[5,16,23]. 유자(*Citrus junos*)는 운향과 감귤속 후생감귤아속에 속하며, 후생감귤아속 중에서도 오래된 과수로 반 교목성이며 수세가 강하고 직립성이며, 탕자와 아울러 내한성과 내병성이 강한 것으로 알려져 있

고 신라시대에 중국에서 우리나라로 전래되어 제주도, 고흥, 거창, 완도, 장흥, 강진, 거제 및 남해 등의 남해안에 걸쳐 재배되어 온 것으로 전해지며, 과실은 예부터 향기가 좋아 제수용이나, 약용으로 널리 이용되어져 왔다[12,15]. 또한, 강한 신맛으로 인해 생식으로는 거의 이용되지 않고 차 등의 음료에 이용되고 있으며 민간에서는 고미건위제, 진해거담제, 감기약, 두통약 등으로 사용되는 등 그 약리효능이 이미 잘 알려져 있다.

한편, 주로 유선에서 발생하는 선암종의 일종인 유방암은 국내 여성암 중 발병률이 1위를 차지하고 있어 그 위험성이 계속 높아지고 있다[14,21]. 지금까지 천연물 추출물로부터 유방암 세포주인 MCF-7에 대한 항암 활성은 다수 보고되어 있으며[1,6,11] 특히, Chen 등[2]은 이소플라본이 환경호르몬인 estradiol과 에스트로겐의 결합을 방해함으로써 유방암 유전자의 발현을 저해하고 있다고 보고하고 있어 천연물 추출물이 유방암의 예방과 치료에 유효한 물질인 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 다양한 효능과 기능성을 지니고 있으며, 식품가공분야에서도 활용도가 높을 것으로 기대되는 것임에도 불구하고 유방암과 관련된 연구가 미흡한 탕자 과피 추출물(PTP)을 이용하여 MCF-7 세포의 성장 억제 활성과 환

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7557, Fax : +82-51-206-0848

E-mail : ykj9912@dau.ac.kr

경호르몬에 의해 유도된 유방암 저해 효과를 유자 과피 추출물(CJP)과 비교함으로써 이들 과피를 생리활성 식품소재로서의 기초 자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 과피 추출물의 제조

실험에 사용한 유자는 일반시장에서(남해산) 구입하였으며, 탱자는 경상북도 청도군에서 재배된 것을 구입하였다. 각 열매의 과육과 분리한 과피를 동결건조 하고 파쇄한 후, 각 과피의 건조물 중량에 대해 각 10배의 80% EtOH을 가하여 60°C에서 환류 냉각시키면서 6시간씩 2회 반복 추출하였다. 추출물을 감압 여과(pore size 6 mm)하고 여액을 50°C에서 회전식 진공증발 농축기로 완전 건조 시킨 후 -80°C에서 냉동보관 하면서 실험에 사용하였다.

### 시약 및 기기

RPMI 1640, FBS (fetal bovine serum), trypsin-EDTA (0.25% trypsin, hybri-Max, SRB (sulforhodamine B), TCA (trichloro acetic acid), RNase, marker, agarose gel, PI (phosphatidylinositol) 등은 Sigma (USA)에서 구입하였으며 Tris-HCl buffer는 Aldrich사로부터 구입하였다. Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit는 BioVision (USA)로부터 구입하였으며 Bisphenol A, RPMI 1640 Medium modified는 Sigma (USA), Sterile fetal bovine serum charcoal stripped (cFBS)는 Valley Biomedical Inc. 121 (Germany)에서 구입하였다. CO<sub>2</sub> incubator는 Vision사의 VS-9108MS를 사용하였으며 microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Finland)로, Hoechst 염색에 의한 핵의 관찰은 형광현미경(BH2-BH2-RPL-T3, Olympus optical CO. Ltd. Japan), 세포주기 분석은 flow cytometer (EPICS XL, Beckman Coulter, USA)를 사용하였다.

### 세포주 배양

실험에 사용한 MCF-7 (human breast cancer) 세포를 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB<sup>®</sup>)으로부터 분양받아 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

### SRB assay에 의한 암세포 성장 억제 효과

Monolayer로 자란 암세포주 MCF-7 세포를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single 세포로 만들어 5×10<sup>4</sup> cell/ml로 조절하여 48well plate에 분주하고 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 plate에 세포의 부착을 확인하고 CJP와 PTP를 농도별로 첨가하여 각각 24, 48, 72시간 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 배양액을 제거하고 각

well에 12% TCA를 100 ml 씩 가해 4°C에서 1시간 동안 고정시킨 후 증류수로 5회 세척하여 건조하였다. 각 well에 1% 빙초산에 녹인 0.4% SRB 용액을 50 ml 씩 가하여 실온에서 60분간 염색한 후 1% acetic acid로 4~5회 세척하여 건조시키고 10 mM Tris buffer 100 ml로 충분히 용출시킨 뒤 상등액을 96well plate용 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Hoechst 염색을 통한 핵의 관찰

CJP와 PTP가 MCF-7 사멸의 항암 활성에 있어서 세포사멸과의 관련여부를 확인하기 위해 bis-benzimide (Hoechst 33258) 염색 후 핵의 형태변화를 관찰하였다[3]. MCF-7 세포를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single 세포로 만든 후 최종 세포농도가 5×10<sup>5</sup> cell/ml 되도록 희석하여 50 mm Dish에 분주한 다음 37°C, 5.5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 부착된 세포에 CJP와 PTP를 각각 300 mg/ml와 500 mg/ml로 처리하여 48시간동안 반응시킨 후 PBS로 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 용액 0.5 ml과 배지 1 ml을 첨가하여 세포를 회수하고 형광 염색물질인 hoechst 용액(0.5 mg/ml)를 100 ml첨가하여 30분간 염색하고 PBS로 2회 세척하여 형광현미경을 이용하여 핵의 형태변화를 정상군과 비교하였다.

### DNA 단편화

Monolayer로 자란 MCF-7 세포를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single 세포로 만들어 최종 세포농도 5×10<sup>6</sup> cell/ml를 24시간 배양하여 CJP와 PTP를 각각 300 mg/ml와 500 mg/ml로 처리하여 48시간 또는 72시간 동안 반응시킨 다음 DNA를 분리하였다. 상층액을 회수한 후 PBS로 세척하고 trypsin EDTA를 처리하여 세포를 회수 후 원심분리 하여 다시 세포를 회수하였다. 이 세포에 20% SDS 125 ml를 첨가하고 55°C에서 4시간 이상 반응 시켜 6 N NaCl 675 ml 첨가하여 반응을 정지시킨 뒤 상층액에 phenol buffer 2.5 ml을 첨가하여 1시간 동안 shaking하여 상층액을 모으고 phenol:chloroform:iso-amylalcohol (25:24:1)을 동량 처리하여 15분 동안 shaking 후 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 여기에 chloroform:iso-amylalcohol (24:1)을 동량 처리하여 정제되도록 15분 shaking하여 상층액을 회수한 다음 차가운 에탄올을 첨가하여 4°C에서 12시간 방치하여 DNA를 침전시켰다. 상층액을 4°C에서 9,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 침전물을 회수 후 건조시킨 뒤 TE buffer 20 ml로 녹여낸 다음 RNase 1 ml를 첨가하여 37°C, 1시간 방치 시킨 후 ×6 dye을 4 ml 첨가하여 1.5% agarose gel에서 100 V, 2시간 loading하여 UV 상에서 촬영하였다[4].

### 세포주기 분석

Monolayer로 자란 MCF-7 세포를 0.25% trypsin-EDTA용

액으로 처리하여 single 세포로 만든 후 최종 세포농도가  $5 \times 10^5$  cell/ml 되도록 희석하여 각 50 mm dish 당 2 ml 씩 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 부착하였다. 부착된 세포는 배지를 제거 후 농도별로 희석한 CJP와 PTP를 각각 500 ml 씩 각 well에 첨가하여 총 볼륨 5 ml이 되게 한 후 각각 48시간 더 반응시켜 배지를 제거한 다음 PBS로 2회 세척하여 0.25% trypsin-EDTA용액 0.5 ml와 배지 1 ml을 첨가하여 세포를 회수했다. 회수된 세포는 cold ethyl alcohol을 최종 볼륨의 70%가 되도록 하여 세포를 고정시키고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 폐기하고 PBS 1 ml을 첨가하여 교반 후, 원심을 반복하여 세포를 회수하였다. PI 용액 40 ml와 RNase 2 ml를 PBS 1 ml에 희석하여 각 농도별로 첨가한 후 37°C 암소에서 30분간 반응하여 flow cytometer를 이용하여 세포의 주기를 분석하였다[17].

#### Caspase-3 활성 측정

세포사멸이 유도된 세포를 회수하여 cold cell lysis buffer 50 ml를 첨가하고 얼음에 10분간 방치한 후 1,000×g에서 1분간 원심분리하고 상층액을 회수하여 cold cell lysis buffer 50 ml로 희석하였다. 10 mM DTT가 첨가된 reaction buffer 50 ml와 LEHD-pNA 5 ml를 첨가하여 37°C에서 1~2시간 방치한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Caspase-3 activity} = \frac{\text{OD of test sample} - \text{OD of blank}}{\text{OD of control} - \text{OD of blank}}$$

#### 환경호르몬에 의해 유도된 암세포의 성장 억제 효과

Monolayer로 자란 MCF-7 세포를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single 세포로 만들고  $5 \times 10^4$  cell/ml로 조절하여 48well plate에 분주하고 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. CJP와 PTP를 처리하기 1~2시간 전에 배양한 세포의 배지를 흡입하고 1% cFBS가 들어간 배지로 교환하였다. 여기에 미리 녹여 준비한 bisphenol A와 esradiol 각 25 ml와 CJP와 PTP를 각각 25 ml씩 혼합하여 총 볼륨이 250 ml가 되게 분주 후 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양하고 SRB assay를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다[7].

### 결과 및 고찰

#### 암세포 성장 억제 효과

본 연구에서는 SRB assay법[18]을 이용하여 MCF-7 유방암 세포에 대한 유자와 탱자 과피 추출물의 항암 효과를 살펴보았다. SRB assay법은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 실험으로, 비교적 주위환경에 덜 민감하며 중간 대사산물에 영향을 받지 않는 안정한 end

point를 제공해 주는 것으로 알려져 있다[20]. CJP와 PTP에 의한 MCF-7 세포주의 성장 억제 효과를 Fig. 1에 나타내었다. MCF-7 세포에 CJP와 PTP를 각각 1, 5, 10, 50, 100, 300 mg/ml 첨가하고 24 hr, 48 hr, 72 hr 배양한 결과, 24시간 배양한 경우에는 CJP와 PTP가 1~50 mg/ml까지는 10% 미만의 성장 억제 효과를 보였으나 100 mg/ml 이상에서는 20% 이상의 효과를 보였다. 또한 48시간 배양한 경우, 1~10 mg/ml 범위에서는 농도와 배양시간 의존적으로 암세포의 성장을 억제하였으며 특히, PTP를 300 mg/ml로 처리 하였을 때는 60%이상의 유방암 세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 또한, PTP가 CJP보다 더 뛰어난 항암 효과를 지니고 있음을 알았다. Yoo 등[24]은 유자 추출물이 전립선 암세포주인 DU145와 LN-Cap의 세포 성장 억제 효과를 보였다고 보고하고 있으며 이러한 암세포 사멸효과는 유자에 함유된 지용성 및 수용성 물질들이 함께 작용하여 세포 사멸 효과에 좋은 활성을 나타내는 것으로 보고하고 있다. 또한, Jayaprakasha 등[9]은 탱자 추출물로부터 분리한 HPCME (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid 2-methyl ester)가 강한 항산화 능력과 함께 대장암세포 HT-29에 대해서 시간과 농도 의존적으로 암세포의 성장을 저해한다고 보고하고 있다. 또한, Kawaii 등[13]과 Johnson 등[10]은 과일 등에 함유된 수용성 기능성 물질인 flavonoid와 epigalloocatechin gallate, quercetin 등에 의한 암세포 억제 효과를 규명하고 있어, 본 연구에서도 유자와 탱자 과피 추출물에 함유된 지용성 및 수용성의 자유기 소거활성 물질이 MCF-7 세포주의 성장 억제에 효과가 있는 것으로 사료된다.

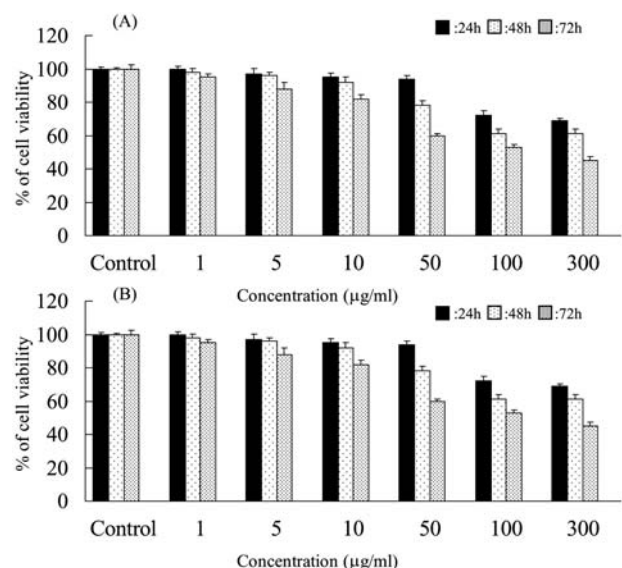


Fig. 1. Inhibition of the cell growth viability by (A) CJP and (B) PTP in MCF-7 breast cancer cells. The results represents the means±SD and averages of triplicate experiments.

Hoechst 염색을 통한 핵의 관찰

본 연구에서는 유자와 탱자 과피 추출물의 첨가에 따른 MCF-7 세포의 증식억제효과가 세포사멸과 관련하는지를 확인하고자 Hoechst 염색을 시행하여 세포질 및 핵질 간의 이동 여부 및 세포 사멸체 형성을 관찰하였다(Fig. 2). CJP와 PTP를 각각 300 mg/ml와 500 mg/ml로 처리하여 48시간 배양한 결과, CJP를 500 mg/ml 처리한 MCF-7 세포와 PTP를 300과 500 mg/ml로 첨가한 MCF-7 세포에서는 세포막이 파괴되며 세포사멸로 인해 형성되는 세포 사멸체를 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 CJP보다 PTP에서 더 뚜렷이 관찰되어 PTP가 세포사멸을 더 효율적으로 유도함을 알 수 있었다.

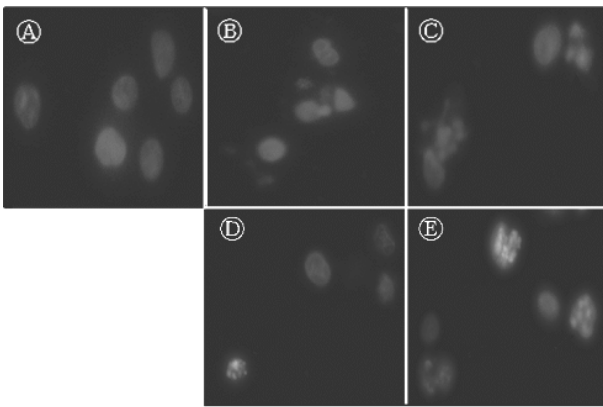


Fig. 2. Nuclear fragmentation was induced by CJP and PTP in MCF-7 breast cancer cells. (A): Control, (B): MCF-7 treated with CJP 300 mg/ml for 48 hr, (C): MCF-7 treated with CJP 500 mg/ml for 48 hr, (D): MCF-7 treated with PTP 300 mg/ml for 48 hr, (E): MCF-7 treated with PTP 500 mg/ml for 48 hr

DNA 단편화

CJP와 PTP가 세포사멸을 유도함에 있어서 DNA 단편화를 형성하는 지를 관찰하기 위해 CJP와 PTP를 처리한 MCF-7 세포로부터 DNA를 분리하여 DNA 단편화 형성을 살펴보았다(Fig. 3). 그 결과, CJP와 PTP 농도를 300 mg/ml로 처리한 경우 뚜렷한 DNA 단편화를 확인할 수 없었으나 500 mg/ml 처리한 경우 DNA laddering이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, Hoechst 염색의 결과처럼 CJP 보다 PTP에서 더 많은 DNA 단편화가 관찰되었다. Jayaprakasha 등[9]의 bromide staining을 통한 *Poncirus trifoliata* (L.) Raf의 추출물을 처리한 대장암 세포주(colon cancer, HT-29)에서 세포사멸이 관찰된 것과 Yi 등[3]의 탱자 과육 열수 추출물로부터 농도 증가에 따른 전골수성 백혈병 세포의 세포사멸체 형성 증가와 DNA 단편화의 증가 등에 의한 연구 결과들도 본 연구 결과와 유사함을 나타내어 유자와 탱자 과피 추출물이 암세포의 DNA 단편화를 유발함을 확인할 수 있었다.

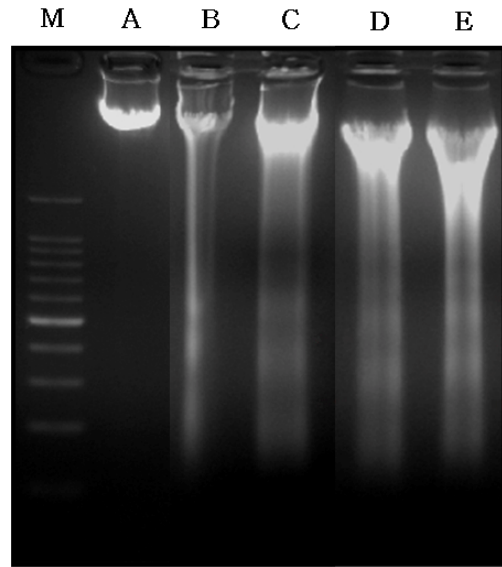


Fig. 3. DNA ladder pattern formation in the MCF-7 breast cancer cells after treatment with CJP and PTP. M: Marker, A: Control, B: MCF-7 treated with Citrus junos 300 mg/ml for 72 hr, C: MCF-7 treated with Citrus junos 500 mg/ml for 72 hr, D: MCF-7 treated with Poncirus trifoliata 300 mg/ml for 48 hr, E: MCF-7 treated with Poncirus trifoliata 500 mg/ml for 48 hr

세포주기 분석

CJP와 PTP가 MCF-7 세포의 세포사멸을 유발함에 있어 세포주기에 있어 어떤 단계에 관련하는지를 알아보기 위하여 각각 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후, P.I. (propidium iodide) staining하여 flow cytometry로 세포주기를 분석하였다. 먼저, CJP를 농도별로 첨가한 결과, sub-G1기는 농도에 의존하여 증가하였으며 반대로 G1기는 미세한 감소를 보였으며, 세포분열이 일어나는 S기는 500 mg/ml에서 감소를 보였으며, G2/M기는 500 mg/ml에서 급격히 증가함을 알았다(Fig. 4). 또한, PTP를 농도별로 처리한 결과, sub-G1기는 농도에 의존하여 급격한 증가를 보였으며 G1기는 100 mg/ml까지는 증가를 보이다 300 mg/ml부터는 감소하여 500 mg/ml에서는 급격한 감소를 나타냈다. S기와 G2/M에 있어서는 100 mg/ml 농도에서 2배 정도 낮은 값을 보였고 이러한 현상은 300 mg/ml와 500 mg/ml에서도 관측되었다(Fig. 5). 이상의 결과로 CJP와 PTP를 MCF-7 유방암 세포주에 처리할 경우, 농도 의존적으로 sub-G1기가 증가함을 알 수 있었다. 즉, CJP의 경우, 대조구와 비교하여 500 mg/ml에서는 20배 정도의 급격한 증가율을 나타내었고 PTP는 500 mg/ml에서는 100배 이상의 증가를 보여 추출물 첨가 농도에 따라 급격히 sub-G1기가 증가함을 알 수 있었다. Yi 등[23]도 탱자 열수 추출물이 전골수성 백혈병세포에서 농도에 비례하여 sub-G1기가 증가하였으며, 500 mg/ml에서는 88.66%의 sub-G1기가 나타나 sub-G1기 증가에 의한

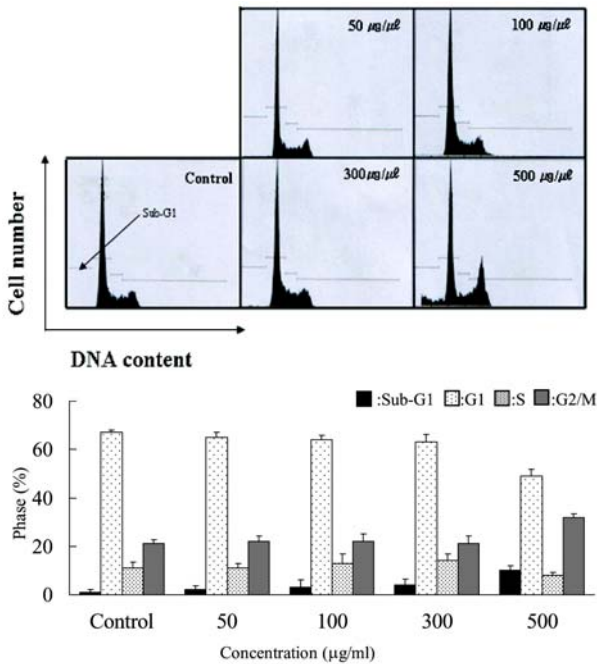


Fig. 4. Effects of CJP on cell cycle distribution in the MCF-7 breast cancer cells after incubation for 48 hr. The results represents the means±SD and averages of triplicate experiments.

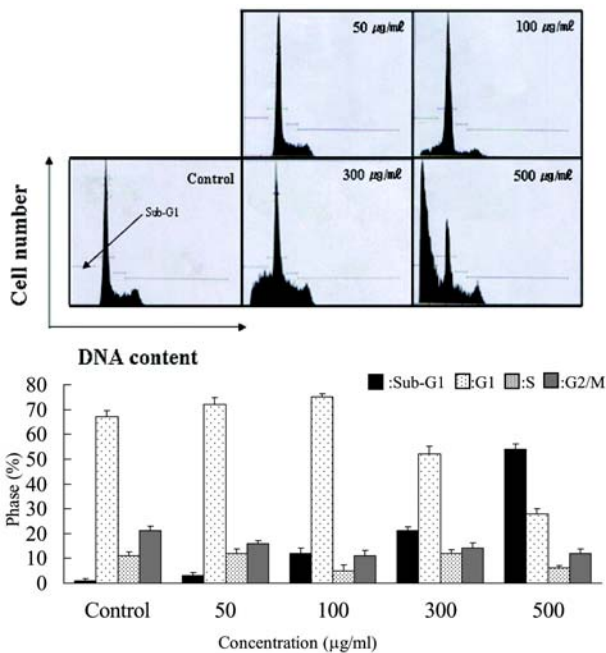


Fig. 5. Effects of PTP on cell cycle distribution in the MCF-7 breast cancer cells after incubation for 48 hr. The results represents the means±SD and averages of triplicate experiments.

세포사멸을 보고하고 있다. 본 연구에서도 CJP와 PTP가 MCF-7 세포의 sub-G1기를 지연·증가시켜 사멸을 유도하

는 것으로 생각된다.

Caspase-3 활성

Caspase는 세포사멸 시 활성화되는 중요한 단백질 분해효소로 이 효소를 측정하여 자가사멸의 정도를 파악할 수 있다. Caspase-3활성을 측정하는 분석법은 세포내에서 자가사멸이 유도되어 단백분해효소가 활성화 되면, caspase-3효소는 세포내의 p-nitroanilide와의 기질 결합체인 LEHD-pNA를 분해하여 푸른빛의 pNA와 LEHD를 형성하는 것을 이용하였다[8,22]. CJP와 PTP에 의해 세포사멸이 유도된 MCF-7 세포에서의 caspase-3 활성을 Fig. 6에 나타내었다. CJP와 PTP를 첨가 하였을 경우 모두 농도 의존적으로 caspase-3 활성이 증가하였으며, CJP에 있어서는 300 mg/ml에서는 대조군의 3배 이상의 caspase-3 활성이 나타났고 PTP에 있어서는 300 mg/ml에서는 11배에 가까운 caspase-3활성 증가를 나타내어, PTP의 caspase-3 활성이 CJP에 비해 3배 이상 높게 caspase-3 효소 활성을 유도함을 알 수 있었다. 이는 CJP와 PTP가 MCF-7 세포주의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도함에 있어서 적어도 caspase-3 활성에 의존적으로 일어남을 확인할 수 있었다.

환경호르몬에 의해 유도된 암세포의 성장 억제 효과

내분비 교란물질로 알려진 bisphenol A와 estradiol은 여성 호르몬인 estrogen과 경쟁적으로 결합하여 progesteron 수용체의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있으며, MCF-7 유방암 세포의 증식을 유도하는 물질로 알려져 있다[24,25]. 본 연구에서는 CJP와 PTP가 bisphenol A와 estradiol에 의해 유도된 MCF-7 세포의 증식 억제 효과에 대하여 알아보고 그

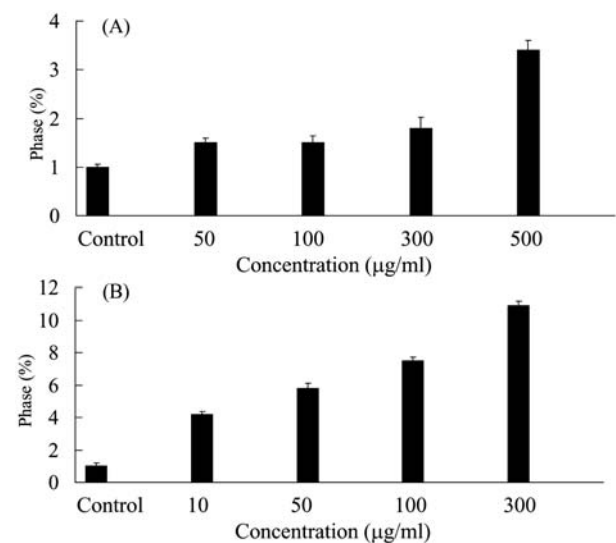


Fig. 6. Effects of (A) CJP and (B) PTP on caspase-3 activity in the MCF-7 breast cancer cells. The results represents the means±SD and averages of triplicate experiments.

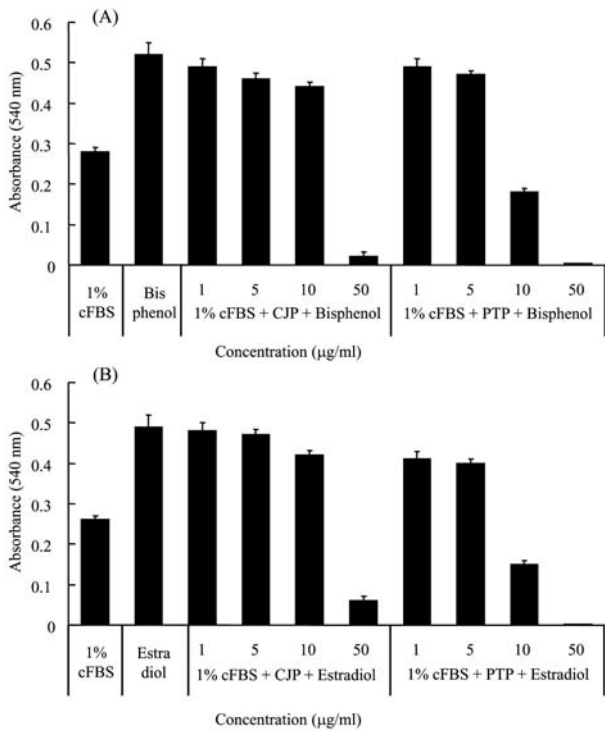


Fig. 7. Anti-proliferation effects of CJP and PTP on MCF-7 cells treated with (A) 0.1mM bisphenol and (B) 0.1 mM estradiol. The results represents the means±SD and averages of triplicate experiments.

결과를 Fig. 7에 나타내었다. MCF-7 세포에 1% cFBS와 bisphenol A 또는 estradiol 만을 첨가한 경우, 흡광도가 각각 0.53과 0.50으로 나타나 대조구와 비교하여 MCF-7 세포는 약 2배의 세포 증식을 나타내어 이들 환경호르몬이 유방암 세포를 증식시키는 것으로 나타났다. 그러나 이들 환경호르몬에 CJP와 PTP를 농도별로 첨가하여 세포 증식에 대하여 조사한 결과, 두 시료 모두 농도 의존적으로 MCF-7 세포 증식 억제효과를 나타내었다. 즉, CJP로 처리한 경우, 50 mg/ml에서 각각 0.05와 0.06으로 급격히 감소되어 환경호르몬에 의해 증식되는 MCF-7 세포의 세포증식을 억제함을 알 수 있었으며, PTP에 있어서는 10 mg/ml에서 0.19와 0.17을 나타내어 강한 세포 증식을 저해함을 알 수 있었다. 또한 PTP가 CJP 보다 환경호르몬에 의한 MCF-7 세포 증식을 더 강하게 억제하고 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 통해 CJP와 PTP는 estrogen 유사물질로 내분비 교란 물질인 bisphenol A와 estradiol에 의해 발생할 수 있는 유방암의 발병을 유의하게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 현재, CJP와 PTP의 활성 성분에 대한 연구가 진행 중이다.

요 약

본 연구는 MCF-7 유방암 세포에 대한 유자(CJP)와 탕자

(PTP) 과피 추출물의 항암 활성과 환경호르몬에 의해 유도된 암세포의 증식 억제 효과에 대하여 조사하였다. CJP와 PTP를 300 mg/ml 농도에서 72시간 처리하였을 경우, 암세포의 성장을 저해하였고 세포사멸을 유도하였다. MCF-7 유방암 세포의 형태학적 변화는 CJP와 PTP를 500 mg/ml 농도에서 72시간 처리하였을 경우 관측되었고 세포사멸은 caspase-3의 활성화에 의하여 유도되었다. 환경호르몬에 의해 유도된 MCF-7 유방암 세포의 증식은 CJP와 PTP의 처리로 인하여 농도 의존적으로 감소하였으며, 300 mg/ml 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 각각 70%와 80% 이상 감소하였다.

감사의 글

이 논문은 동아대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

References

1. Aobchey, P., S. Sinchaikul, S. Phutrakul and S. T. Chen. 2007. Simple purification of indirubin from *Indigofera tinctoria* Linn. and inhibitory effect on MCF-7 human breast cancer cells. *Chiang Mai Journal of Science* **34**, 329-337.
2. Chen, W. F., M. H. Huang, C. H. Tzang, M. Yang and M. S. Wong. 2003. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* **1638**, 187-196.
3. Choi, Y. H., J. H. Baek, M. A. Yoo, H. Y. Chung and K. W. Kim. 2000. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **17**, 971-976.
4. Choi, Y. H., H. S. Eo, Y. G. Jin, Y. H. Yoo and N. Kim. 2003. Apoptosis and modulation of cell control by synthetic derivatives of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in human prostate cancer cells. *Cancer Letters* **199**, 157-167.
5. Chung, H. S., J. B. Lee, J. H. Seong and J. U. Choi. 2004. Chemical components in peel and flesh of trifoliata oranges (*Poncirus trifoliata*). *Kor. J. Food Pre.* **11**, 342-346.
6. Dong, S., A. Inoue, Y. Zyu, M. Tanji and R. Kiyama. 2007. Activation of rapid signaling pathways and the subsequent transcriptional regulation for the proliferation of breast cancer MCF-7 cells by the treatment with an extract of *Glycyrrhiza glabra* root. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 2470-2478.
7. Han, D. H., Y. Miyazaki and H. Tachibana. 2000. Optimization of estrogenic activity detection method using human breast cancer MCF-7 cells. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* **44**, 339-348.
8. Hwang, Y. J., H. K. Nam, M. J. Chang, G. W. Noh and S. H. Kim. 2003. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii*. Extracts on proliferation and apoptosis in human



- colon cancer cell lines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 217-222.
9. Jayaprakasha, G. K., K. Mandadi, K. Poullose, M. Shibu, Y. Jadegoud, G. Gowda, G. A. Nagana, G. Patil and S. Bhimanagouda. 2007. Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 4923-4932.
  10. Johnson, M. K. and G. Loo. 2000. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat. RES.* **459**, 211-218.
  11. Kang, S. C., C. M. Lee, E. S. Choung, J. P. Bak, J. J. Bae, H. S. Yoo, J. H. Kwak and O. P. Zee. 2008. Anti-proliferative effects of estrogen receptor-modulating compounds isolated from *Rheum palmatum*. *Archives of Pharmacol Research* **31**, 722-726.
  12. Kang, S. K., M. J. Jang and Y. D. Kim. 2006. A study on the flavor constituents of the Citron (*Citrus junos*). *Kor. J. Food Preserv.* **13**, 204-210.
  13. Kawai, S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa and M. Yano. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3565-3571.
  14. Kim, H. W., S. J. Cho, B. Y. Kim and S. I. Cho. 2007. Anti-oxidant effects of *Anemarrhenae Rhizoma* in three different lineages. *Kor. J. Orient. Int. Med.* **28**, 608-614.
  15. Kim, T. J., J. Y. No and J. S. Ko. 1989. The separation and determination of flavonoid glycosides from *Poncirus trifoliata rafia* and *Citrus aurantium*. *L. J. Kor. Soc. Ana. Sci.* **2**, 302-307.
  16. Lee, Y. G. and I. H. Cha. 2001. Antibacterial activity of *Poncirus trifoliata* juice against pathogenic bacteria. *Kor. J. Life Sci.* **11**, 534-560.
  17. Murakami, H. and T. Sugahara. 1994. *Animal cell technology*, pp. 215-233, Corona Publishing Co. Japan.
  18. Nakagawa, Y. and T. Suzuki. 2001. Metabolism for bisphenol A in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of a hydroxylated metabolite in MCF-7 human breast cancer cell. *Xenobiotica* **31**, 113-123.
  19. Park, K. D., B. S. Han and K. H. Rhim. 2006. Modifying effect of bisphenol A on the preneoplastic and neoplastic lesion if rat liver treated with diethylnitrosamine infusion. *Kor. J. Env. Hlth.* **32**, 60-66.
  20. Skehan, P. R., D. Stoveng, A. Scudiero, J. Monks, D. McMahon, J. T. Vistica, H. Warren, S. Bokesch, M. Kenney and R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *T. Nat. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
  21. Soung, M. G., S. M. Joo, A. R. Song and N. D. Sung. 2007. QSAR on the inhibition activity of flavopiridol analogues against breast cancer MCF-7. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 147-153.
  22. Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449.
  23. Yi, J. M., M. S. Kim, H. N. Koo, B. K. Song, H. Y. Yoo and H. M. Kim. 2004. *Poncirus trifoliata* fruit induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Clinica Chimica Acta.* **340**, 179-185.
  24. Yoo, K. M. and I. K. Hwang. 2004. *In vitro* Effect of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 339-344.