

적양배추 추출물이 인체 유방암 세포 MDA-MB-231의 세포사멸에 미치는 영향

남미경 · 강금지[†]

덕성여자대학교 자연과학대학 식품영양학과

The Effect of Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) Extract on the Apoptosis in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

Mi Kyung Nam and Keum Jee Kang[†]

Dept. of Food & Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

We investigated the effect of red cabbage extract (RCE) on cell death in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Cells were cultured in the presence 1.0, 1.5, and 2.0 mg/mL concentrations of RCE for 24 hours. MTT assays demonstrated that mitochondrial dehydrogenase activities decreased in a dose-dependent manner in cells ($p < 0.05$). In contrast, the proportion of dual staining with Hoechst 33342/ethidium bromide (EtBr) for cell death increased in a dose-dependent manner in cells ($p < 0.05$). Flow cytometry assays revealed that cell death caused by an apoptotic program increased in a dose-dependent ($p < 0.05$). Also, increased ROS accumulation in cells, as revealed by DCF-DA staining, was observed in a dose-dependent fashion ($p < 0.05$). The apoptosis suppressor gene Bcl-2 decreased significantly at the mRNA level. Pro-apoptotic genes Bax and caspase-3, genes that are related to the last stage of apoptosis significantly increased. The Bcl-2/Bax ratio which is an important indicator of apoptosis, was found to have significantly decreased dose dependence. These results taken together indicate that the effect of red cabbage extract induces cell death in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

Key words: red cabbage, MDA-MB-231 cell, apoptosis, Bcl-2, Bax, caspase-3

서 론

우리나라의 경우 최근 10년간 암에 의한 사망률이 점차 증가하고 있는 추세이며, 그중에서도 유방암은 여성에게 발병률이 높은 암으로 보고되고 있다(1). 유방암의 발병률이 증가하고 있는 원인으로 고지방, 고칼로리로 대변되는 서구화된 식생활과 채소·과일 섭취 부족 등의 변화를 들 수 있다(2-4). 이로 인해 한국인의 식생활에 있어서 채소류의 중요성이 부각되고 있는 실정이다.

세포사멸(apoptosis)은 계획된 세포죽음(programmed cell death)으로 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체 방어 메커니즘이라는 점에서 세포괴사(necrosis)와 구별되어지는데 세포 분열과 함께 정상 조직 괴사의 조절과 유지에 중요한 역할을 하며 세포의 항상성을 유지하기도 한다(5,6). 세포사멸을 결정하는데 여러 가지 요인이 작용을 하는데 그중에서도 Bcl-2 family가 중요한 역할을 수행한다. Bcl-2 family는 세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-2와 세포사멸을 유도하는 유전자인 Bax로 분류되며, Bcl-2/Bax 비율에 따라 세포사멸을 조절한다(7). 그 외 세포사멸 메커니즘의 중요한 조절

인자인 caspase는 apoptosis를 위하여 적어도 2~3개의 caspase들이 관련되어 작용하며, 유방암에서 caspase-3가 결핍 또는 감소되었음이 보고되었다(8).

Brassica species에 속하는 적양배추는 흰색 양배추보다는 과당과 포도당, 라이신, 비타민 C 등의 영양 성분이 더 많고 또한 셀레늄이 풍부하다(9). 적양배추는 indole-3-carbinol(I3C)를 함유하며 이는 암이 빠르게 진행되는 과정에 관여하는 효소의 작용을 차단하는 기능이 있다는 사실이 발견되었다(10). 특히 적양배추의 붉은색을 내는 성분인 flavonoid류 중 anthocyanin은 항산화 효능이 뛰어나서 암세포 증식을 억제하고 세포의 염증 반응을 줄이며, free radical에 의한 세포손상을 막아 준다(11,12). 또한 적양배추는 노화억제(13), 콜레스테롤 저하작용(14), 항균(15,16), 심장, 간 보호(17) 및 당뇨쥐에서의 신기능 회복(18) 등에도 효과가 있는 것으로 알려졌다. 항산화 활성 면에서 천연 항산화제인 α -tocopherol보다 5~7배의 강한 효능을 나타낸다고 한다(19). 그 외에 베타카로틴과 루테인 등도 함유되어 있기 때문에 눈의 황변성을 감소시킴으로써 눈을 건강하게 해준다(20).

적양배추에 함유된 인돌, 안토시아닌과 같은 생리활성 물질의 항암 효과는 보고되었지만 적양배추 추출물을 이용하

[†]Corresponding author. E-mail: kjkang@duksung.ac.kr
Phone: 82-2-901-8363, Fax: 82-2-901-8372

여 유방암 세포에 대한 세포화학적 분석을 이용한 항암효과에 대한 보고는 없는 실정이다. 이에 본 연구는 적양배추 에탄올 추출물에 포함된 다양한 생리활성 물질들의 복합물이 처리 농도에 따라 세포사멸에 미치는 영향을 핵 염색법, flow cytometry를 통하여 확인하였고, 세포사멸과 관련된 유전자 Bcl-2, Bax, caspase-3의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 적양배추의 항유방암의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에서 사용된 적양배추(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*)는 충남 논산시 연무읍 보라농장으로부터 무농약 농산물 인증(제13-06-3-39)을 받은 생체소를 제공 받았다. 2009년 8월 27일 재배를 시작하여 2009년 12월 30일 수확하였으며, 수확 후에는 저온저장 하였다.

시료 제조

적양배추는 심을 제거한 뒤, 깨끗이 수세하여 동결건조기(OPR-FDU-9603, Operon, Seoul, Korea)를 이용하여 수분을 제거하였다. 건조된 시료는 분쇄기를 사용하여 분말 형태로 만들었고, 시료무게(60 g)의 20배량(w/v)의 70% 에탄올(120 mL)을 이용하여 4°C 저온실에서 24시간 rocking한 뒤 멸균된 여과지(No.26, Adventec, Berlin, Germany)를 이용해 적양배추 입자와 불용성물질을 제거하였다. 그 후 4°C에서 10,000 rpm에서 2시간 high centrifugation(LE-80, Beckman, Washington, DC, USA), 3,000 rpm에서 30분간 centrifugation(Labo fuge400, Heraeus, Berlin, Germany)을 하여 얻은 상층액을 25,000 rpm에서 2시간 ultracentrifugation(LE-80, Beckman)하여 순수한 용액을 얻었다. Speed vacuum concentration(AES1010, Savant, Washington, DC, USA)을 이용하여 농축하였으며, 이 중 휘발되지 않은 물의 무게를 빼고 남은 최종 농축액(0.5 g)에 증류수(10 mL)를 첨가하여 추출물의 농도가 50 mg/mL가 되도록 희석하였다. 완성된 적양배추 추출물(red cabbage extract, RCE)은 eppendorf tube(E-tube)에 100 µL씩 소분하여 -70°C에 냉동 보관하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 인체 유방암 세포 MDA-MB-231(이후는 "세포"로 함)은 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, 10% fetal bovin serum(FBS, Welgene, Seoul, Korea)과 1% penicillin streptomycin(Sigma, Washington, DC, USA)을 넣은 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Welgene)의 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 100 mm(r=5.0 cm) 계대배양접시에 10 mL의 배양액을 이용하여 세포를 증식시켰으며, 세포가 접시 바닥의 80~90% 증식하면 phosphate buf-

fered saline solution(PBS)로 세척하고, trypsin ethylene-diamine-tetraacetic acid(trypsin-EDTA, Welgene)를 처리하여 계대배양을 해주었다.

시료 첨가

세포를 seeding 후 plate에 유착되면 50 mg/mL RCE를 배양액 1 mL 기준 10, 15, 20, 25, 30, 35 및 40 µL를 첨가하여, 최종 농도가 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 및 2.0 mg/mL가 되도록 하였고, 대조군(control)으로는 세포의 배양액인 DMEM을 사용하였으며 추출물 첨가에 따른 효과가 추출물의 용매인 70% EtOH 처리와 독립적인지 확인하기 위하여 예비실험을 한 결과 대조군에 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

RCE 처리에 따른 세포의 생존율을 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포를 96 well plate에 13×10^3 cells의 세포농도로 seeding 한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 plate 바닥에 세포가 유착되어 안정될 때까지 증식시킨 후 RCE를 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 및 2.0 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양시간이 끝난 후 MTT 용액(5 mg/mL, PBS, pH 7.4) 10 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 40분 후 현미경 명시야 DIC filter 사진 촬영을 하여 미토콘드리아 탈수소효소의 활성 정도를 시각화하였으며, 2시간 반응 후에는 50 µL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 살아있는 세포의 생성에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시켰다. 그 후 분광광도계를 이용하여(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세포생존율은 대조군의 흡광도를 100%로 하여 각 처리군의 흡광도를 상대적인 백분율로 나타내었으며, 이를 바탕으로 흡광도를 50%로 감소시킬 수 있는 시료의 농도(IC₅₀, half maximal inhibitory concentration)와 앞으로 수행될 실험에 사용될 농도를 산출하였다.

Hoechst33342/ethidium bromide에 의한 세포사멸/괴사 분석

RCE 처리가 세포의 막투과성 이외에 실제적으로 사멸을 유도하는 지를 조사하기 위하여 DNA-특이 형광염료로 막투과성이 있는 Hoechst 33342와 막 투과성이 없는 ethidium bromide(EtBr) 핵산-특이 형광염료를 이용하여 알아보았다. 세포막의 투과성 여부뿐만 아니라 세포의 핵을 보다 명확하게 사멸 또는 괴사 인지를 구분하기 위하여 기존에 보고된 Hoshino 등(21)의 이중염색법을 수정하여 적용하였다. RCE를 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL의 농도로 24시간 처리 후, PBS로 3번 수세 후 Hoechst 33342와 EtBr를 각각 10 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 37°C hot plate에 5분간 방치한 뒤 상층액의 반을 제거하고 다시 PBS로 채운 후, 형광현미경으로 관찰하여 영상을 기록하고 이를 세포사멸/괴사를 score 하는데 이용하였다. 각 영상은 adobe photoshop을 이용하여 Hoe-

chst 33342 염색된 세포 및 명시아 세포수를 총세포수로, EtBr 염색된 핵이지만 온전한 핵은 NVN(Non-viable cells)로, EtBr 염색된 핵이지만 응축되고 절편화된 핵은 NVA(Non-viable cells with apoptotic nuclei)로 계상하였다. 이를 Comes 등(22)이 보고한 formula를 이용하여 세포사멸 및 세포괴사를 구분하였으며, 둘의 합을 구하여 총 세포사로 하였다. 각 군마다 총 1,000개 이상의 세포를 계상하여 각 비율을 구하였으며, 모든 실험분석은 3회 반복하였다.

Propidium iodide(PI)를 이용한 flow cytometry 분석

RCE가 세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 DNA 염기서열에 특이적으로 반응하고, 핵의 형태와 막의 손상유무를 기초로 하여 붉은색으로 염색되어 apoptosis 세포를 구분해주는 propidium iodide(PI, Sigma) 형광염료를 이용하여 분석하였다. Apoptosis된 세포 내 DNA를 염색해 주는 PI(Sigma) 염료를 RCE가 24시간 처리된 세포에 2 µg/mL 농도로 첨가한 후 37°C incubator에서 20분간 방치하였다. 방치시간이 끝나면 800 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 제거하고 PBS 세척을 2회 반복하였고, trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 10,000 rpm에서 2분간 원심분리 하여 최종 남은 세포 pellet을 single cell을 만들어 분석하였다. 모든 sample은 분석할 때까지 ice에 저장하였으며, flow cytometer(Cell Lab Quanta™ SC, Beckman, Chicago, IL, USA)의 FL-3 filter에서 apoptosis된 세포를 측정하였다.

DCF-DA에 의한 세포내 reactive oxygen species(ROS) 측정

세포 독성으로 작용하는 과산화지질의 생성과 세포 손상을 가져오는 ROS를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA, Sigma) 형광염료를 이용하였다. Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)으로 수세된 세포에 deaeration 시킨 800 nM의 DCF-DA를 첨가하여 20분간 37°C의 배양기에서 반응시켰다. 그 후 즉시 HBSS와 차가운 PBS로 수세하였으며, 형광현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰 및 촬영하였고, 무작위로 선정된 현미경 시야의 DCF-DA 염색 세포를 기록한 후 처리군 별 전체 세포

수에 대한 DCF-DA 염색 세포를 백분율(%)로 표시하였다.

역전사-DNA 중합연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)에 의한 세포사멸 관련 유전자 분석

사멸유도에 관여하는 유전자의 발현을 관찰하기 위해 RCE를 농도별로 처리한 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA로부터 표적 유전자의 mRNA를 역전사시켜 cDNA를 합성하고 세포사멸에 관여하는 유전자인 Bcl-2, Bax, caspase-3를 첨가하여 PCR을 수행하였다(Table 1). PCR sample의 총 부피는 50 µL로 2 µL의 RT산물, 5 µL의 10×buffer, 5 µL의 dNTP, 3 µL의 25 mM MgCl₂, 10 pmol/µL의 sense와 antisense primer pair(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 각각 1 µL씩 넣어주고 0.2 µL의 Taq DNA polymerase(Promega, Madison, WI, USA)를 넣어준 후, total volume 50 µL에 맞추기 위해서 멸균한 증류수를 첨가하였다. Denaturation 반응은 94°C에서 5분 동안 시켰으며, 94°C에서 30초, 55°C, 58°C(primer마다 annealing온도가 다름)에서 30초, 72°C에서 1분 동안 35 cycles 반응시킨 후, 72°C에서 10분 동안 post extension 시킨 후 세포사멸에 관여하는 유전자가 발현하는 정도를 시각화하기 위하여 전기영동을 시행하였다. PCR 산물을 1.0% agarose(cat No. 50004, BMA, Washington, DC, USA) gel(1×tris-acetate-EDTA buffer, 1.0% agar, 1 mg/mL ethidium bromide)에서 20분 동안 100 voltage에서 전기영동을 한 후 image analyzer(Gel doc XR+, Bio-Rad)로 관찰하였다. 세포 관련 유전자의 발현 정도를 수치화하기 위하여 Image J 프로그램(NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)을 이용하였고 PCR 산물의 발현정도는 Quantity one program(NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)을 이용하여 수치화하였으며, 세포사멸 유전자의 대조군으로 사용되는 GAPDH 수치에 대한 각각의 유전자의 상대적인 비율(%)을 결정하였고 Bcl-2/Bax의 비율을 산출하였다. 이를 SPSS program(12.0, IBM, Seoul, Korea)을 이용하여 유의성을 검증하였다.

Table 1. Apoptosis gene primers and their sequence with conditions uses for PCR

Genes	Primer	Sequence	Cycle
Bcl-2	Sense	5'-AGCTGCACCTGACGCCCTTCA-3'	94°C 30 sec
	Antisense	5'-AGCCAGGAGAAATCACAGAGG-3'	55°C 30 sec 72°C 1 min
Bax	Sense	5'-ATGGACGGGTCCGGGGAGCAG-3'	94°C 30 sec
	Antisense	5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'	58°C 30 sec 72°C 1 min
Caspase-3	Sense	5'-TTAATAAAGGTATCCATGGAGAACA-3'	94°C 30 sec
	Antisense	5'-TTAGTGATAAAAATAGAGTTCTTTGTGAG-3'	58°C 30 sec 72°C 1 min
GAPDH	Sense	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	94°C 30 sec
	Antisense	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	60°C 30 sec 72°C 1 min

통계처리

각각의 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였으며, 얻어진 결과는 평균과 표준편차 또는 %로 표시하였다. 실험군 간의 유의성 차이는 SPSS program(12.0, IBM)을 이용하여 ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

세포 생존율

RCE를 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 및 2.0 mg/mL의 농도로 세포에 첨가하여 24시간 배양한 뒤 MTT 용액을 첨가하여 분석한 결과 대조군에는 거의 모든 세포에서 진한 보라색의 formazan을 형성하였으나, RCE를 처리한 군에서는 농도가 높아짐에 따라 보라색의 formazan을 형성하는 세포가 줄어드는 것은 물론 formazan의 색도 점점 옅어지는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 고농도인 2.0 mg/mL에서는 색을 띄지 않는 세포가 많이 발견되었는데 이는 세포가 사멸되어 미토콘드리아의 탈수소효소 반응이 일어나지 않아 보라색 formazan을 형성하지 못한 것을 알 수 있었다(Fig. 1A). 이렇게 형성된 formazan을 흡광도를 측정하여 대조군 세포 생존율을 100% 기준으로 정하고 비교해 본 결과 RCE 처리 농도가 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 및 2.0 mg/mL로 증가함에 따라 세포 생존율이 92%, 82%, 79%, 72%, 54%, 42% 및 38%로 유의적으로 감소함을 볼 수 있었다($p < 0.05$)(Fig.

1B). Ju 등(23)은 적양배추 메탄올추출물을 인체 유방암세포 MCF-7에 처리했을 때 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타냈다고 보고하였으며, Gamet-Payrastre 등(24)은 적양배추가 속하는 십자화채소에 다량 함유된 유기황 성분인 L-sulforaphane을 인체 대장암 세포 HT-29에 15 $\mu\text{mol/L}$ 를 처리했을 때 거의 모든 세포가 사멸되었고, 인체 전립선 암세포인 PC-3에 40 $\mu\text{mol/L}$ 를 처리했을 때 50% 이상 생존율이 감소되었으며, 인체 간암세포인 HepG2와 자궁경부암 세포인 HeLa에서 15 $\mu\text{mol/L}$ 를 처리했을 때 생존율이 50% 미만으로 감소되었다고 보고하였다.

본 연구에서도 RCE의 처리 농도가 높을수록 세포의 생존율을 유의적 감소시켰으며, 특히 2.0 mg/mL 처리군에서 세포생존율 감소에 가장 효과적임이 관찰되었다. 또한 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL의 농도에서 농도 간 생존율이 유의적으로 감소하여 이 농도를 앞으로 수행되는 실험에 사용하였다($p < 0.05$).

세포사멸/괴사분석

세포사멸이 일어나고 있는 핵의 상태를 보다 명확하게 조사하기 위하여 EtBr(red)와 Hoechst 33342(blue) 이중염색을 이용하여 apoptotic 세포와 non-apoptotic 세포를 구별하였다. Hoechst 33342/EtBr 이중염색을 통한 핵 구별 원리는 살아있는 세포일 경우 Hoechst 염색액이 침투하여 정상적인 핵을 가지며 선명한 파란색을 나타내고, apoptotic 세포들은 염색질 농축 등 apoptotic body가 존재하면서 파란색과 빨간색을 동시에 보인다. 또한 non-apoptotic 세포들은 EtBr

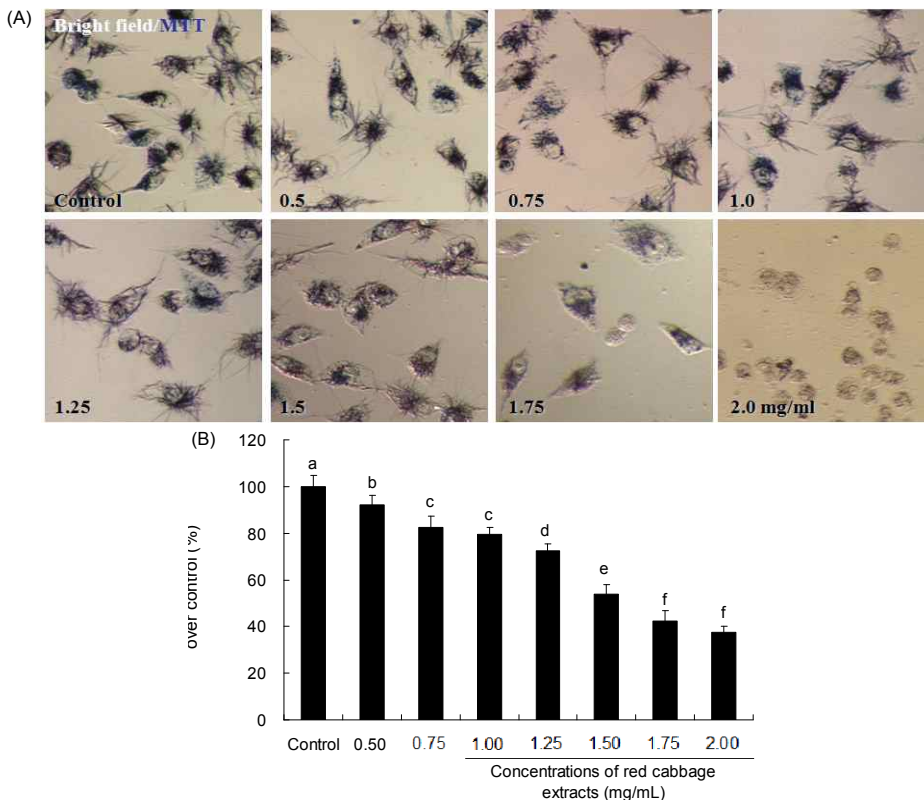


Fig. 1. The effect of red cabbage extract (RCE) on cell viability in human breast cancer MDA-MB-231 cells. (A) Cytochemical visualization of mitochondrial dehydrogenase activities in MDA-MB-231. (B) Quantitative analysis of the enzyme activity by MTT assay. The values are mean \pm SD of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$. The vehicle alone without RCE served as a control.

염색에 침투에 의하여 선명한 빨간색만을 나타낸다. RCE를 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL의 농도로 24시간 처리 후, EtBr과 Hoechst 33342 염색혼합액을 첨가하여 형광현미경에서 사진 촬영한 결과 대조군에서는 어떠한 형태 변화도 찾아볼 수 없었고 세포사멸도 일어나지 않아 붉은색의 EtBr로 염색된 세포가 거의 없었으나 RCE 처리 농도가 높아질수록 붉은색의 EtBr로 염색되는 세포가 점차 증가하였다(Fig. 2A). 특히 RCE 1.0 mg/mL 처리군은 세포막이 파괴되어 apoptosis로 인해 형성되는 세포 사멸체가 발견되었으며 1.5, 2.0 mg/mL 처리군에서는 세포 사멸체와 핵의 응축이 증가하였고 염색 질 농축 및 핵의 구멍 등이 더 뚜렷이 관찰되어졌다(Fig. 2A). Apoptotic 세포와 non-apoptotic 세포를 구분하고 정량 수치화하여 세포사멸율을 나타낸 결과 대조군에서는 세포사멸율이 0.6%로 거의 관찰되지 않았으나 RCE 1.0 mg/mL 처리

군에서는 non-apoptotic cell과 apoptotic cell이 2.3%와 6.5%로 차이가 나기 시작하였고 총 사멸율은 8.8%를 나타냈으며, 1.5 mg/mL 처리군에서는 non-apoptotic cell과 apoptotic cell이 4.1%와 8.1%로 총 사멸율은 12.2%를 나타내었고, 2.0 mg/mL 처리군에서는 non-apoptotic cell과 apoptotic cell이 7.3%와 32.7%로 apoptosis가 유의적으로 증가하였으며 총 사멸율도 40%로 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 2B). RCE 농도가 높아짐에 따라 apoptosis의 급격한 증가는 수동적 세포예정사인 necrosis와는 달리 세포 내부의 신호에 따라 여러 단백질 활성의 조절과 유전자의 발현을 통하여 일어나는 능동적인 세포예정사이므로 RCE의 항암효과를 확신해주는 결과라 할 수 있다. 세포사멸의 증가는 MTT 분석 결과와 유사한 경향을 나타낸 것으로 보아 미토콘드리아 탈수소효소의 활성이 감소되면서 연이어 세포사멸이 증가되는 것으로 사료된다.

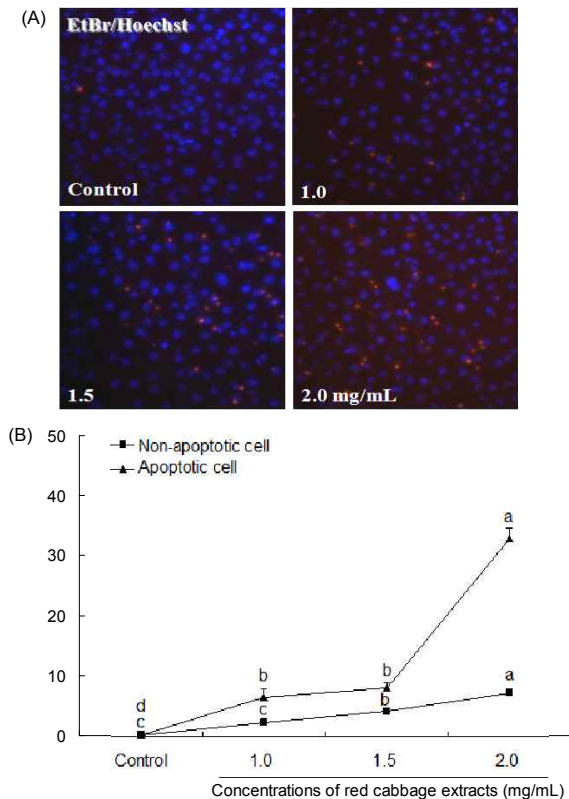


Fig. 2. The effect of red cabbage extract (RCE) on cell death by apoptosis or non-apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. (A) Morphological changes in MDA-MB-231 cells induced by red cabbage extract. (B) Quantitative analysis of MDA-MB-231 cells death by apoptosis or non-apoptosis. MDA-MB-231 cells strained with Hoechst 33342+ethidium bromide. Viable cells displayed a faint blue (Hoechst 33342) fluorescent staining, apoptotic cells an intense blue staining in combination with the presence of apoptotic bodies, necrotic cells a red (ethidium bromide) staining, and secondary necrotic cells (or late apoptotic cells) a red staining in the presence of apoptotic bodies. The ratio between apoptotic and non-apoptotic dead cells was calculated and reported as a percentage of the total number of cell counted. The values are average of three experiments analyzed. Different alphabet represents the significant differences among concentrations at $p < 0.05$.

FACS에 의한 세포사멸율

RCE의 농도에 따른 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 보다 확실하게 증명하기 위하여 early apoptosis까지 측정할 수 있는 FACS로 PI의 형광밀도를 측정하였다(Fig. 3). 사멸율은 유입된 전체 세포에 대한 PI 양성반응 세포의 비율을 %로 나타냈으며 그래프 peak의 오른쪽 이동은 PI의 양성반응 세포가 증가하여 형광밀도가 커져 apoptosis 진행이 많이 일어났음을 시사한다. 사멸율을 분석한 결과 대조군은 4.88%, RCE 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL 처리군에서는 각각 8.15%, 22.92%, 80.57% 나타냈으며, RCE 농도가 높아짐에 따라 그래프 peak가 오른쪽으로 이동하는 것으로 보아 농도 의존적으로 PI 양성반응 세포가 증가하여 apoptosis가 효과적으로 일어남을 알 수 있다. 특히 2.0 mg/mL 처리군에서 80.57%의 높은 사멸율을 보였는데 이는 비교적 낮은 형광밀도를 가진 세포도 측정된 것으로 사료되어 미세한 변화도 측정이 가능함을 알 수 있었다. 적양배추가 속하는 십자화과 채소에서 발견되는 sulforaphane을 대장암세포에 15 μ M 처리하여 flow cytometry 분석을 한 결과 시간 의존적으로 apoptosis를 일으킨다고 보고가 있는데(24), 이는 RCE도 동일한 농도로 첨가하여 시간별로 관찰한다면 시간 의존적으로 apoptosis 일으킬 수 있는 가능성을 제시해주었다.

ROS 측정

활성산소는 생체세포를 공격하여 과산화지질의 형성과 단백질 핵산을 파괴하고 여러 가지 효소 기능을 억제하여 암 유발과 노화를 촉진한다고 하였다(25). MTT, Hoechst와 EtBr염색법, FACS 분석의 결과 적양배추 처리 후 세포는 농도가 높을수록 세포 활성 저하와 세포사멸 효과가 나타났다. 이와 같은 결과가 세포내에 축적되어 있는 ROS의 생성과 연관이 있는 지를 알아보았다. ROS 생성 정도를 시각화하였을 때 대조군은 DCF-DA로 염색된 세포가 적은 것으로 보아 아직 ROS의 생성이 활발하지 않은 것을 알 수 있었다.

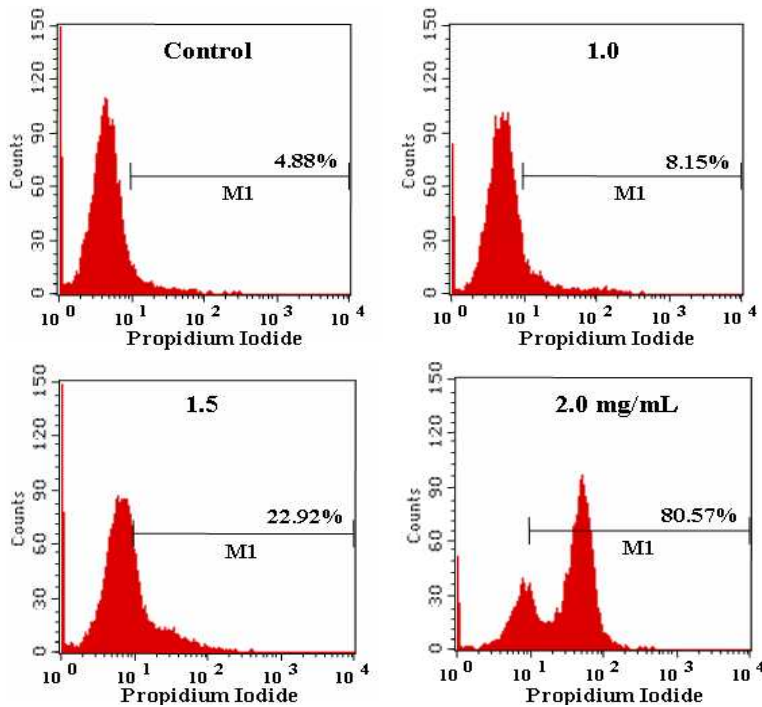


Fig. 3. The effect of red cabbage extract (RCE) treatment on the apoptosis and early apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells. To estimate obvious apoptosis. After 24 h incubation with RCE, apoptosis and early apoptosis detected by flow cytometry using PI staining. The letter M₁ in the graph represent cells stained by PI. Concentration-dependant change in percentage of each area was shown in M₁.

반면 RCE 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL 처리군은 농도가 증가함에 따라 DCF-DA로 염색된 세포가 점차 증가하였으며, 특히 2.0 mg/mL 처리군은 positive control(+)인 H₂O₂ 처리군과 비슷한 경향을 보였다(Fig. 4A). RCE 처리군의 ROS는 농도의존적으로 유의성을 띄며 증가되었다(p<0.05)(Fig. 4B). 추출물 처리에 의한 ROS의 증가는 암의 증식 및 유지 이상의 산화적 스트레스를 받아 결국 세포사멸을 가져오게 한다(26). Lee와 Hwang(27)은 암세포에서 유전자 조작 또는 화학적인 방법으로 인하여 세포 증식 억제가 유도되었을 경우 ROS를 발생하며, 산화적 손상을 야기하여 노화 형질이 나타난다고 보고하였다. 또한 Benhar 등(28)은 암세포에서의 활성산소와 stress activated protein kinases(SAPKs)의 축적은 세포사멸의 중요한 요소임을 보고하였으며, 적절한 ROS는 암세포의 성장에 도움을 주지만 지속적인 축적은 apop-

tosis를 증가시킨다고 하였다.

따라서 본 실험에서도 RCE 처리에 따른 세포사멸과 ROS 축적 증가는 상관관계가 있으며, 2.0 mg/mL 처리군에서의 세포사멸 효과는 ROS의 급격한 증가로 인한 것으로 사료된다.

세포사멸관련 유전자 발현

RCE가 세포의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포의 사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-2, 사멸을 유도하는 유전자인 Bax, 세포사멸의 마지막 신호 전달 경로 관련 유전자인 caspase-3를 대조군인 GAPDH와 비교 분석하였다(Fig. 5A). 그 결과 RCE의 처리농도가 높아짐에 따라 mRNA 수준에서 세포사멸 억제 유전자인 Bcl-2의 발현은 유의적으로 감소하였으나, 반대로 세포사멸 유도 유전자인 Bax의 발

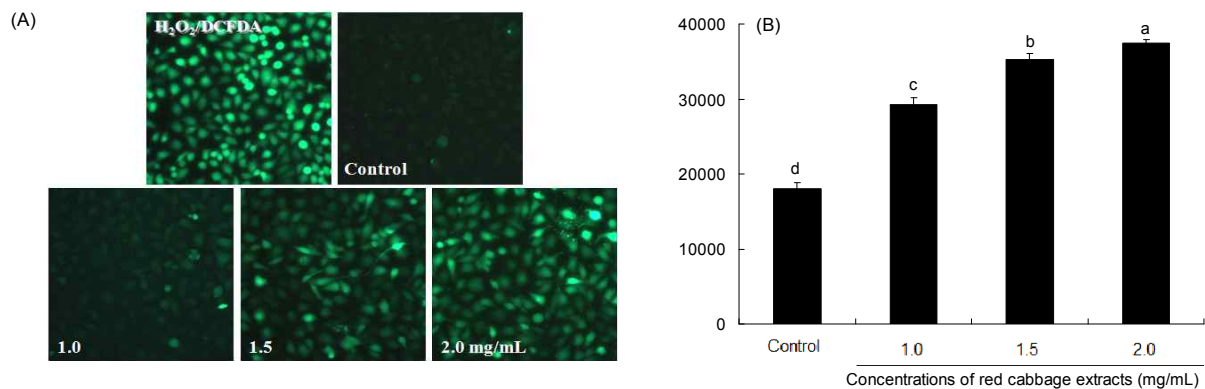


Fig. 4. The effect of red cabbage extract (RCE) on ROS accumulation in MDA-MB-231 cells. (A) Typical images of DCF-DA-stained cells in different treatment groups. (B) Quantitative analysis of ROS accumulation in cells with different treatment groups. The values are mean±SD of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at p<0.05.

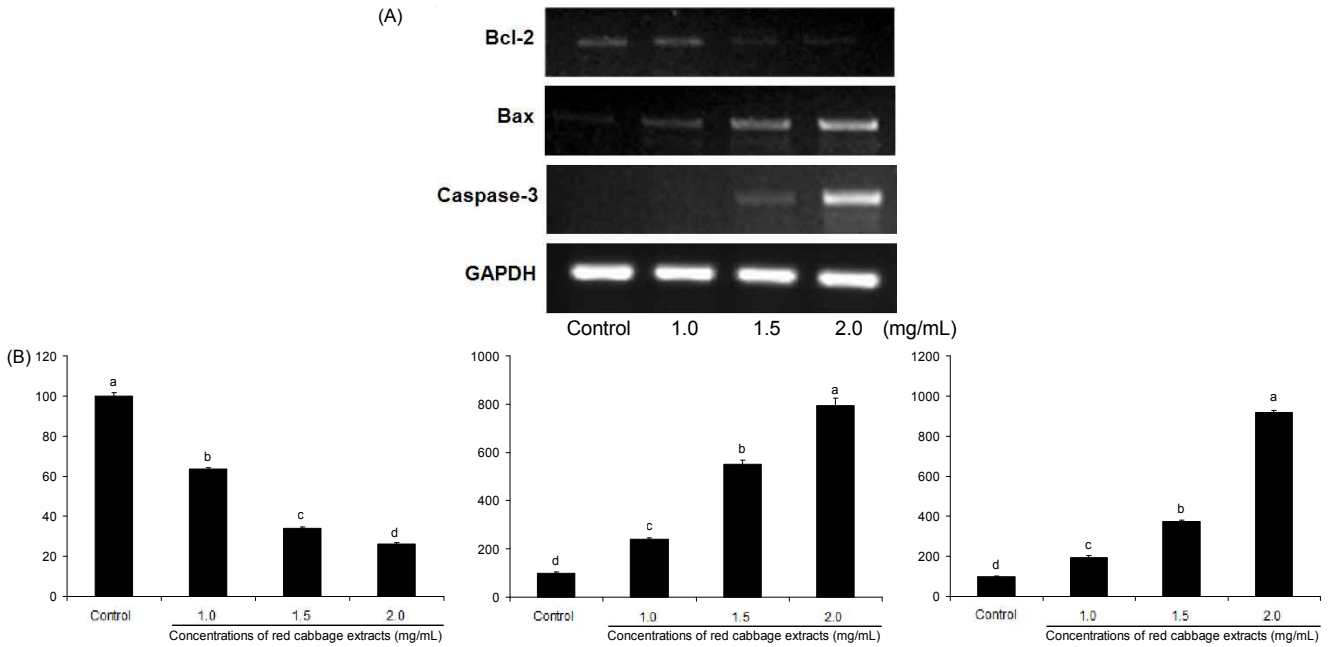


Fig. 5. The effect of red cabbage extract (RCE) on the Bcl-2, Bax, caspase-3 mRNA expression in human breast cancer MDA-MB-231 cells. (A) Image of PCR products. (B) Quantitative analysis of RT-PCR products. GAPDH was served as internal control. The values are mean±SD of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$. The vehicle alone without RCE served as a control.

현은 RCE의 처리농도가 높아짐에 따라 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 5B). Bcl-2 family는 세포내 중요한 신호 전달체로서 미토콘드리아의 안정성을 조절하는 단백질로 알려져 있다. Bax는 세포질에서 미토콘드리아로 이동하면서 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 분비를 촉진하여 세포사멸을 촉진하는 기능을 가지고 있는 반면에 Bcl-2는 미토콘드리아로의 Bax의 이동을 억제시킴으로써 세포사멸을 억제시키는 작용을 한다(29). Bcl-2의 세포사멸을 억제하는 기능이 Bcl-2 family간 균형에 의존하며, 개별 유전자의 수준보다 Bax에 대한 Bcl-2의 비율이 세포의 생존과 사멸을 결정하는데 더 중요하다고 볼 수 있다(30,31). Yang 등(32)은 정상세포에서는 Bcl-2와 Bax는 heterodimer로 존재하는데 산화 스트레스로 인한 DNA 손상을 받으면 p53이 증가하여 세포 내 Bax의 발현이 증가되면 Bax homodimer로 평형이 기울어 세포사멸이 증가되고, 반대로 Bcl-2의 발현이 증가되면 Bcl-2 homodimer로 평형이 기울어 세포사멸이 억제된다고 하였다. 이러한 Bcl-2/Bax heterodimer의 complex의 비율이 50% 이하로 떨어지게 되면 세포사멸이 진행될 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 Bcl-2/Bax의 비율을 구한 결과 대조군에 비해 그 비율이 50% 이하로 낮아졌으며 농도 의존적으로 유의성을 띄며 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 6).

또한 apoptosis를 유도하는 마지막 단계에서 활성화되는 caspase-3의 활성화도 RCE 처리 농도가 높아질수록 유의적으로 증가하였다(Fig. 5B). Caspase-3는 caspase-8, 9의 초기 신호를 증폭시킴으로써 세포사멸인 apoptosis를 일으키는 데 중요한 역할을 하며, caspase의 감소와 결핍은 각종 암에

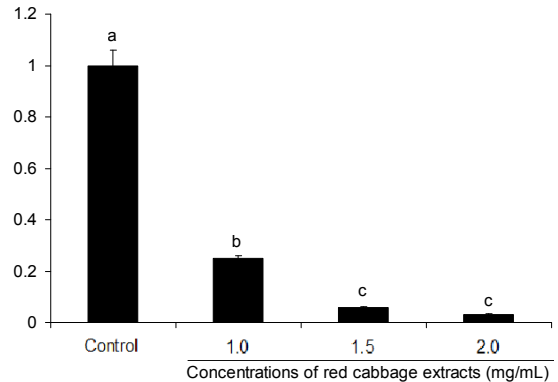


Fig. 6. The effect of red cabbage (RCE) on Bcl-2/Bax ratio in MDA-MB-231 cells. The values are mean±SD of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

서 발견되며 핵의 단백질 구조에 손상을 일으킨다는 보고가 있다(8,33). Caspase의 활성화는 여러 세포에서 세포사멸을 유도하며, pro-caspase-3의 활성화는 cytochrome-c가 미토콘드리아로부터 세포질로 이동하면서 시작된다(34). Bcl-2는 cytochrome-c 분비와 caspase 활성을 억제하는 것으로 알려졌으며, Bax는 이와 반대로 이 과정을 촉진시키는 것으로 보고되어 있다(35). 본 연구의 결과 RCE는 Bcl-2의 발현을 억제하고 Bax의 발현을 증가시키며, caspase-3의 활성을 증가시켜 세포의 사멸에 영향을 준다고 사료되어진다.

요 약

본 연구는 체내 세포배양을 통한 적양배추 추출물의 항유방암 효과를 검증하기 위해 세포활성, 세포사멸, ROS 축적 및 세포사멸 관련 유전자 발현을 분석하였다. 적양배추 추출물을 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 및 2.0 mg/mL의 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율(MTT assay)을 분석한 결과 농도 의존적으로 감소되었다($p < 0.05$). 또한 세포사멸/괴사 분석(Hoechst33342/ethidium bromide 염색법), flow cytometry assay, ROS 측정(DCF-DA 염색법) 등의 세포 화학적 방법을 통해 분석한 결과 처리 농도가 증가할수록 세포사멸이 유의적으로 증가하였고, ROS 생성 또한 증가하였다. 특히 2.0 mg/mL의 농도에서는 다른 농도에 비해 유의적으로 높은 사멸율을 나타내었으며, ROS 또한 다량으로 생성되는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$). RT-PCR을 통해 세포사멸 관련 유전자인 Bcl-2, Bax, caspase-3의 mRNA 발현 정도를 관찰한 결과 농도 의존적으로 Bcl-2는 유의적으로 감소하였고, Bax와 caspase-3는 유의적으로 증가하였으며, Bcl-2/Bax의 비율은 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이상의 결과로 보아 적양배추 추출물이 인체 유방암세포 MDA-MB-231의 세포사멸을 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 덕성여자대학교 2011년 교내 연구비 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

문 헌

- Ministry of Health and Welfare. 2008. National survey of cancer patients: Analysis of national cancer survey. Seoul, Korea. p 10.
- Kelsey JL, Berowitz GS. 1988. Breast cancer epidemiology. *Cancer Res* 48: 5615-5623.
- Nkondjock A, Ghadirian P. 2005. Risk factors and risk reduction of breast cancer. *Med Sci (Paris)* 21: 175-180.
- Dorai T, Aggarwal BB. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 215: 129-140.
- Park JH, Kim SR, Song ES, Im MW, Lee BL, Lee WY. 2005. Placental apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction or preeclampsia: expression of Bcl-2, Bax and p53. *Korean J Obstet Gynecol* 48: 891-900.
- Vaux DL. 1993. Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci* 90: 786-789.
- Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6.
- Yang XH, Edgerton S, Thor AD. 2005. Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy. *Int J Oncol* 26: 1675-1680.
- Plumb GW, Chambers SJ, Lambert N, Wanigatunga S, Williamson G. 1997. Influence of fruit and vegetable extracts on lipid peroxidation in microsomes containing specific cytochrome P450s. *Food Chem* 60: 161-164.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 20: 933-956.
- Zhu C, Poulson HE, Loft S. 2000. Inhibition of oxidative DNA damage *in vitro* by extracts of brussels sprouts. *Free Rad Res* 33: 187-196.
- Singh J, Upadhyay AK, Bahadur A, Singh B, Singh KP, Rai M. 2006. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Sci Hort* 108: 233-237.
- Heo HJ, Lee CY. 2006. Phenolic phytochemicals in cabbage inhibit amyloid β protein-induced neurotoxicity. *Food Sci Technol* 39: 331-337.
- Komatsu W, Miura Y, Yagasaki K. 1998. Suppression of hypercholesterolemia in hepatoma-bearing rats by cabbage extract and its component, S-methyl-L-cysteine sulfoxide. *Lipids* 33: 499-503.
- Lee SM, Rhee SH, Park KY. 1997. Antimutagenic effect of various cruciferous vegetables in *Salmonella* assaying system. *J Food Hyg Safety* 12: 321-327.
- Cha BC, Lee HW, Choi MY. 1998. Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Korean J Pharmacogn* 29: 28-34.
- Sankhari JM, Thounaojam MC, Jadeja RN, Devkar RV, Ramachandran AV. 2011. Anthocyanin-rich red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extract attenuates cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed an atherogenic diet. *J Sci Food Agric* 92: 1688-1693.
- Kataya HAH, Hamza AA. 2008. Red cabbage (*Brassica oleracea*) ameliorates diabetic nephropathy in rats. *J Evidence-Based Complementary Altern Med* 5: 281-287.
- Bissett DL, Chatter JR, Hannon DP. 1991. Chronic ultraviolet radiation-induced increases in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem Photobiol* 54: 215-223.
- Stoewsand GS. 1995. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables-A review. *Food Chem Toxicol* 33: 537-543.
- Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. 2001. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L509-516.
- Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, Ingravallo G, Modica S, Lo Sasso G, Moschetta A, Guanti G, Simone C. 2007. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* 14: 693-702.
- Ju YH, Carlson KE, Sun J, Pathak D, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Helferich WG. 2000. Estrogenic effects of extracts from cabbage, fermented cabbage, and acidified brussels sprouts on growth and gene expression of estrogen dependent human breast cancer (MCF-7) cells. *J Agric Food Chem* 48: 4628-4634.
- Gamet-Payrastré L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Cholleau S, Gasc N, Tulliez J, Tercé F. 2000. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 60: 1426-1433.
- Nakamura J, Purvis ER, Swenberg JA. 2003. Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31: 1790-1795.
- Schumacker PT. 2006. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 10: 175-176.

27. Lee BY, Hwang ES. 2002. Induction of senescence phenotypes in cancer cells by an acute growth arrest followed by ROS stress. *Korean J Gerontol* 12: 31-39.
28. Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. 2002. ROS, stress-activated kinase and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 5: 420-425.
29. Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
30. Kobayashi T, Ruan S, Clodi K, Kliche KO, Shiku H, Andreeff M, Zhang W. 1998. Overexpression of Bax gene sensitizes K562 erythroleukemia cells to apoptosis induced by selective chemotherapeutic agents. *Oncogene* 16: 1587-1591.
31. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
32. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291.
33. Yu MH, Im HG, Hwang Bo MH, Lee JW, Lee IS. 2005. Induction of apoptosis by immature *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam. *Korean J Food Sci Technol* 37: 221-227.
34. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136.
35. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132.

(2012년 8월 31일 접수; 2012년 11월 12일 채택)