

미강(Rice Bran) 추출물의 HL-60 백혈병 세포 Apoptosis 유도 효과

김은지^{1#} · 문정선^{2#} · 강정일¹ · 이영기¹ · 고영상¹ · 유은숙¹ · 강희경^{1*} · 임동술^{2*}

¹제주대학교 의학전문대학원 의학과, ²삼육대학교 약학대학 약학과

The Effect of Rice Bran Extract on the Apoptosis Induction of HL-60 Leukemia Cells

Eun-Ji Kim^{1#}, Jungsun Moon^{2#}, Jung-Il Kang¹, Young-Ki Lee¹, Young-Sang Koh¹,
Eun-Sook Yoo¹, Hee-Kyoung Kang^{1*} and Dongsool Yim^{2*}

¹Department of Medicine, School of Medicine, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Korea

²College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Abstract – In this study, we investigated the anticancer effect of rice bran extract in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. The extract of rice bran inhibited the proliferation of HL-60 cells. When treated with the rice bran extract, we could observe the apoptotic characteristics such as apoptotic bodies and the increase of sub-G1 hypodiploid cell population, increase of Bax level, decrease of Bcl-2 expression, cleavage of procaspase-3, cleavage of procaspase-9 and cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase(PARP) in HL-60 cells. Furthermore, the apoptosis induction of HL-60 cells treated with the rice bran extract was also accompanied by the inactivation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) such as ERK1/2 MAPK and p38 MAPK. In addition, the rice bran extract induced the down-regulation of c-myc. These data suggested that the rice bran extract could induce the apoptosis via the inactivation of ERK1/2 MAPK and p38 MAPK, and the down-regulation of c-myc in HL-60 acute promyelocytic leukemia cells. The results support that the rice bran extract might have potential for the treatment of acute promyelocytic leukemia.

Key words – rice bran extract; HL-60 cells; apoptosis; MAPK; c-myc

벼(*Oryza sativa* L.)는 외떡잎식물 벼목 화본과의 한해살이 풀이다. 벼를 탈곡하여 길쭉진 왕겨를 벗겨낸 것을 현미라 하고, 현미를 도정하여 속껍질을 벗겨낸 것을 백미라 하는데, 미강(Rice bran)은 백미로 도정하는 과정에서 생기는 과피(果皮), 종피(種皮) 및 호분층(糊粉層) 등의 분쇄혼합물이다.¹⁾ 건강식에 대한 관심이 높아지면서 현미 및 미강에 대한 다양한 생리활성들이 보고되고 있다. 특히, 미강 추출물은 cyclooxygenase-1(COX-1), COX-2 및 5-lipoxygenase (5-LOX)를 억제함으로써 항염증 작용을 하는 것으로 보고되었다.²⁾ 또한, 미강에는 다양한 생리활성물질이 포함되어 있는데, 특히 토코트리에놀(tocotrienols) 및 토코페롤(tocopherols)과 같은 비타민 E가 풍부하게 함유되어 있으며, 이들 성분이 강력한 항산화작용을 한다고 보고되었다.³⁾ 또

한, 토코트리에놀은 조골세포에서 receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL)의 발현을 억제하고, 미강의 토코페롤은 extracellular signal-regulated kinase(ERK)와 NF- κ B 활성화를 저해함으로써 c-fos의 발현을 억제하여 RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 분화를 억제하여 골다공증 개선 효과가 있음이 보고되었다.⁴⁾ 미강유는 제2형 당뇨병 환자에서 저밀도 지단백 콜레스테롤을 감소시켰다는 보고도 있다.⁵⁾ 그 외에 미강 추출물이 HL-60, marmoset B lymphoblastoid B95-8 및 Chinese hamster V79 세포에서 항산화작용 및 항돌연변이 작용을 나타냄이 보고 되었으며,⁶⁾ 유방암, 대장암 및 백혈병 세포에서 유효한 항암작용을 나타냄이 보고되었다.⁷⁻⁹⁾ 이렇듯 미강은 항산화 및 항돌연변이 효과와 함께 항암효능에 대한 보고가 있으나, 항암기전 연구에 대한 보고는 미진한 편이다. 국내에서 암의 발병률은 꾸준히 증가하고 있으며, 2011년 우리나라의 전체 사망자 중 27.8%가 암으로 사망하였다. 특히, 우리나라에서 연 평균 암 발생률 중

[#]The first two authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): pharmkhk@cheju.ac.kr, yimds@syu.ac.kr
(Tel): +82-64-754-3846, +82-2-3399-1604

소아암 환자는 0.59%를 차지하고, 이 중 백혈병이 가장 많은 비율을 차지하고 있다. 뿐만 아니라, 고령인구에서도 그 발병률이 증가되고 있어 백혈병 치료에 대한 중요성이 대두되고 있다.¹⁰⁾ 이에 본 연구에서는 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60세포를 사용하여 미강의 암세포 증식 억제 효과를 검색하고 그 기전을 조사하였다. 미강에 의한 HL-60 세포 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보기 위하여 apoptotic body와 sub-G1 세포수 증가와 같은 apoptosis 특징을 조사하고, apoptosis 유도 신호전달 기전에 중요한 Bcl-2, Bax, caspase-9, caspase-3 및 poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)의 발현 양상을 조사하였다. 또한 세포 성장, 증식 및 사멸 등 다양한 경로 조절에 관여하는 mitogen-activated protein kinases(MAPK) 신호전달 경로 중 extracellular-signal-regulated kinases 1/2(ERK1/2) 및 p38 MAPK 경로의 활성화 여부를 살펴보았다. 이러한 미강의 항암작용기전 규명 연구로 미강을 항암제로 이용할 수 있는 근거를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 추출 - 본 실험에 사용된 미강은 경기도 포천의 식물나라에서 공급받은 일반미의 것을 사용하였다. 총 시료 8 kg을 90% 에탄올 16 L에 넣고 4시간씩 3회 수조에서 70°C로 추출하였다. 추출액을 감압 농축하여, 미강 추출물 1,787 g을 습득하였다. 습득된 미강 추출물은 에탄올에 용해시킨 후 원하는 농도에 따라 실험용 배지로 희석하여 사용하였다.

세포 배양 - HL-60(human promyelocytic leukemia) 세포는 한국 세포 주 은행(Korea Cell Line Bank; KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (GIBCO Inc, NY, USA)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO Inc, NY, USA)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂, humidified incubator에서 배양하였으며, 계대 배양은 약 70-80%의 confluence가 되는 3-4일 마다 한번씩 시행하였다.

세포 독성 측정 - 세포의 성장증식에 대한 미강 추출물의 효과를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 검색법을 이용하여 조사하였다. 살아있는 암세포 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 MTT가 환원되어 형성되는 자주색을 띠는 비수용성의 formazan을 microplate(ELISA) reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여, 생존하면서 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 조사하였다.¹¹⁾ HL-60 세포(3×10^5 cells/mL)를 96 well plate에 넣고 미강 추출물 및 각각의 분획물을 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 및 100 µg/mL의 농도로 처리하였다. 이를 72시간 배양한 다음 MTT(Sigma, MO, USA) 200 µL(2 mg/mL)을 첨가하고 4시간 동안 반응 시킨 후 plate를 1000 rpm에서 5

분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, MO, USA) 150 µL를 가하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식 억제 정도를 조사하였다.

세포주기변화 측정 - HL-60 세포(3×10^5 cells/mL)에 10, 50 및 100 µg/mL의 농도로 미강의 추출물을 처리한 다음, 24시간 동안 배양한 후, 세포를 수확하여 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하였다. 그 후 -20°C에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정 시키고 PBS 세척 후 RNase A(1 mg/mL)를 처리한 다음에 propidium iodide(PI; Sigma, MO, USA)로 염색하고, FACS caliber flow cytometry(Becton Dickinson, USA)로 세포주기를 분석하였다.¹²⁾

핵의 형태학적 변화 관찰 - HL-60 세포(3×10^5 cells/mL)에 10, 50 및 100 µg/mL의 농도로 미강의 추출물을 처리한 다음, 24시간 동안 배양한 후, DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 Hoechst 33342(H33342; Sigma, MO, USA) 용액을 가하여 37°C에서 20분간 염색한 후 형광현미경 (IX-71, Olympus, japan)하에서 관찰하였다.¹³⁾

Western Blot Analysis - HL-60 세포(3×10^5 cells/mL)에 10, 50 및 100 µg/mL의 농도로 미강 추출물을 처리한 다음, 24시간 동안 배양한 후, 세포를 수확하여 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 200 µl의 lysis buffer를 첨가하여 30분 동안 lysis시킨 후 15,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 단백질 농도 분석은 Protein Assay Kit(BIO-RAD, HC, USA)로 정량하였고, standard curve는 BSA (bovine serum albumin)을 표준물질로 사용하였다.¹⁴⁾ 그 후 20 µg의 lysate를 10~12% mini gel SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리한 후, polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane (BIO-RAD, HC, USA)를 사용하여 200 mA, 2시간동안 transfer 하였다. 그 후, 5% skim milk가 함유된 TTBS(TBS containing 0.1% Tween 20)에서 membrane을 1시간동안 blocking 하였다. Bcl-2의 발현량을 확인하기 위해 rabbit monoclonal anti-human Bcl-2 Ab(1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)항체를, Bax의 발현량을 확인하기 위해 rabbit polyclonal anti-human Bax Ab(1:1000) (Santa Cruz Biotech, MA, USA) 항체를, PARP의 발현량을 확인하기 위해 rabbit polyclonal anti-human PARP Ab (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 항체를 사용하였다. 또한, cleaved caspase-3의 발현량을 확인하기 위하여 rabbit monoclonal anti-human cleaved Caspase-3 Ab(1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)항체를, cleaved Caspase-9의 발현량을 확인하기 위하여 rabbit polyclonal anti-human cleaved Caspase-9

Ab(1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 항체를, p38 MAPK의 발현량을 확인하기 위하여 rabbit polyclonal anti-human p38 MAPK Ab (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 항체를, phospho-p38 MAPK의 발현량을 확인하기 위하여 rabbit polyclonal anti-human phospho-p38 MAPK Ab (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 항체를, ERK1/2의 발현을 확인하기 위하여 rabbit polyclonal anti-human p44/42 MAPK Ab (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 항체를, phospho-ERK1/2의 발현을 확인하기 위하여 rabbit polyclonal anti-human phospho-p44/42 MAPK Ab (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 항체를, c-Myc의 발현을 확인하기 위하여 mouse monoclonal c-Myc Ab (1:1000) (Santa Cruz Biotech, CA, USA) 항체를 사용하였다. 각각의 항체들은 TTBS에 희석하여, 4°C에서 overnight 하여 반응시켰다. 2차 항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase) anti-rabbit IgG (1:5000) (American Pharmacia Biotech, NY, USA)와 HRP anti-mouse IgG (1:5000) (American Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 WEST-ZOL® (iNtRON, Gyeonggi-do, Korea)과 반응 시켜 X-ray 필름(AGFA, Belgium)에 감광하였다.

통계처리 - 모든 측정결과는 평균±표준오차로 나타내었으며, 각각의 데이터의 통계학적 유의성 검정은 student's t test을 사용하여 실험군 사이의 통계적 유의성을 평가하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60에서

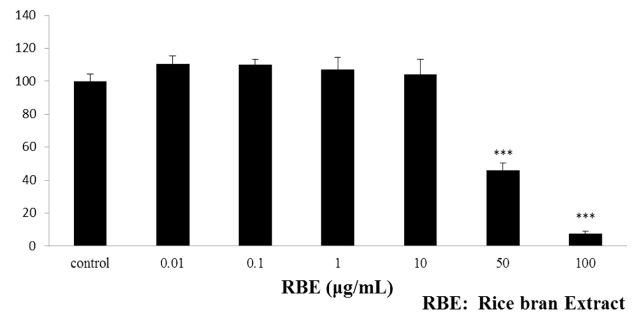


Fig. 1. Rice bran extract (RBE) inhibited the growth of HL-60 cells. HL-60 cells (3×10^5 cells/mL) were treated with RBE (0.01~100 µg/mL) for 72h. Cell viability was measured by MTT assay. The data are presented as mean±SD from representative of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 compared with the control.

미강 추출물의 암세포 증식 억제 효과를 조사하고, 이러한 세포 증식 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 암세포 사멸 기전을 탐색하였다.

암세포 증식 저해 효능 - 미강 추출물의 HL-60 세포 증식에 대한 억제 효과는 MTT assay를 이용하여 검색하였다. 미강 추출물을 0.01, 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL의 농도로 HL-60 세포에 처리한 결과, 47.624±4.183 µg/mL의 IC₅₀값을 나타내어 세포증식에 대한 억제효과를 확인하였다(Fig. 1).

Apoptosis 유도 효과

세포주기변화 측정 - 미강 추출물에 의한 HL-60 세포 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지를 알아보기 위하여 세포주기를 조사하였다. HL-60 세포에 미강 추출물을 10, 50 및 100 µg/mL 농도로 24시간 처리 후, DNA helix에 결합하는 형광물질인 PI를 처리 하였다. 그 후 유세포 분석기를 이용하여 apoptotic 세포인 sub-G1 hypodiploid 세포

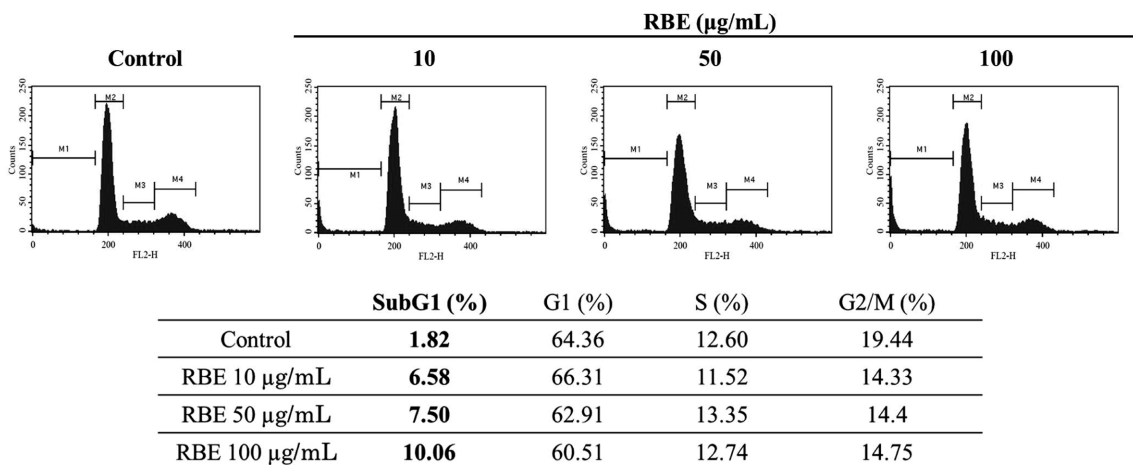


Fig. 2. The rice bran extract (RBE) increased the percentage of sub-G1 peak hypodiploid cells. HL-60 cells (3×10^5 cells/mL) were treated with RBE (10, 50 and 100 µg/mL). After 24h, cells were harvested and fixed by 70% ethanol, and stained by propidium iodide. Sub-G1 cell populations were measured by DNA flow cytometric analysis.

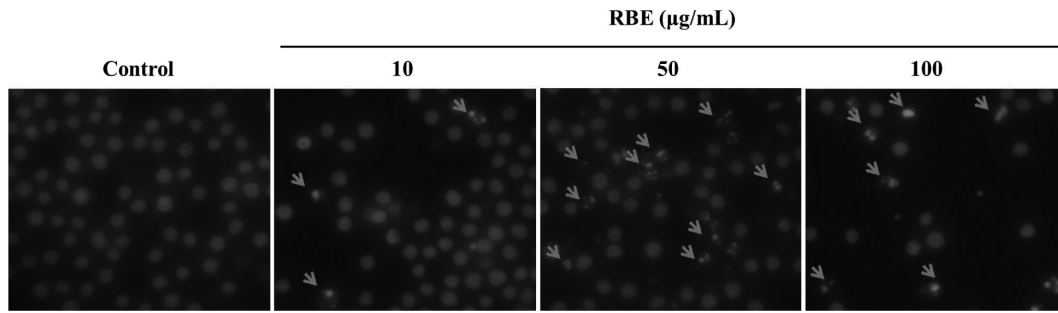


Fig. 3. The rice bran extract (RBE) induced the morphological change in HL-60 cells. HL-60 cells (3×10^5 cells/mL) were treated with RBE (10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). After 24 h, HL-60 cells were stained with DNA-specific fluorescent dye, H33342 (10 $\mu\text{g/mL}$ medium at final). The apoptotic bodies of HL-60 cells were photographed under microscopy (magnification $\times 200$).

의 증가를 분석하였다.¹⁵⁾ 그 결과, 미강 추출물을 10, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 처리하였을 때, sub-G1 hypodiploid 세포가 미강 추출물을 처리하지 않은 대조군 1.8%에 비하여 농도 의존적으로 6.6, 7.5 및 10.1%로 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

핵의 형태학적 변화 - Apoptosis의 형태학적 특징을 확인하기 위해 DNA에 특이적으로 결합하는 Hoechst 33342 dye를 이용하여 핵의 변화를 확인하였다. Hoechst 33342로 DNA를 염색하고 관찰한 결과, 미강 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 미강 추출물 처리에 의하여 농도 의존적으로 핵의 응축 및 apoptotic body의 증가하는 형태학적 변화들을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

본 실험의 결과를 미루어 보아 미강 추출물은 농도 의존적으로 HL-60 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

Bcl-2 및 Bax 발현 양상의 변화 - 미강 추출물에 의한 HL-60 세포의 apoptosis 유도 기전을 밝히기 위하여 Bcl-2 family 중 anti-apoptosis protein인 Bcl-2와 pro-apoptosis protein인 Bax의 발현을 조사하였다. Bcl-2 family는 apoptosis를 억제하는 것과 촉진하는 집단으로 나눌 수 있는데, 대표적으로 Bcl-2는 apoptosis를 억제하며 Bax 등은 apoptosis를 촉진하는 작용을 한다.¹⁵⁾ HL-60 세포에 미강 추출물을 10, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 처리 후 Bcl-2와 Bax의 발현양상을 확인하였다. 그 결과, Bcl-2의 발현이 미강 추출물 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였으며, Bax의 발현은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4). DNA 토포이소머라제 I(DNA topoisomerase I)의 저해제로 작용하는 항암제인 캄토테신(Camptothecin)은 백혈병 세포에서 Bcl-2의 발현을 감소시키고, Bax의 발현을 증가시킴으로써 백혈병 세포의 apoptosis를 유도함이 보고되었다.¹⁶⁾ 미강 추출물은 농도 의존적으로 HL-60 세포에서 pro-apoptosis protein인 Bax의 증가와 anti-apoptosis protein인 Bcl-2의 감소시켜 apoptosis를 유도하였을 것으로 사료된다.

Caspase-3 및 Caspase-9의 활성화 - Caspase cascade는 다양한 apoptosis signal의 공통적인 경로로서, 특히

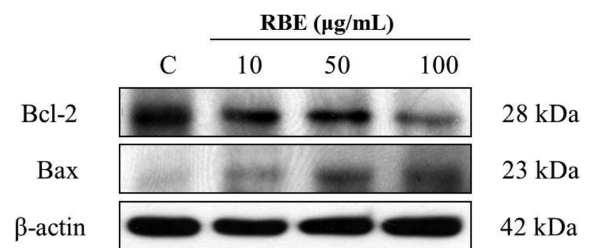


Fig. 4. The effect of rice bran extract (RBE) on the expression of Bcl-2 and Bax in HL-60. HL-60 cells (3×10^5 cells/mL) were treated with RBE (10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. The levels of Bcl-2 and Bax were analyzed by western blotting using specific antibodies.

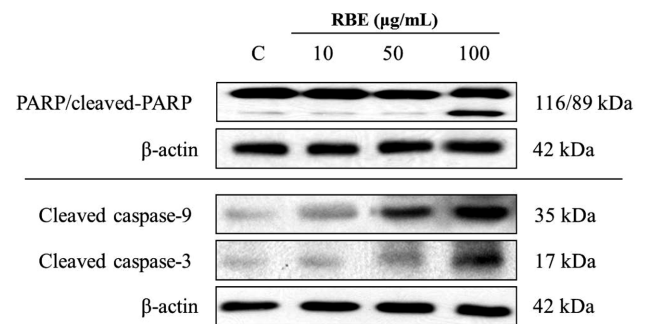


Fig. 5. The effect of rice bran extract (RBE) on the expression of cleaved-caspase-9, cleaved-caspase-3 and PARP in HL-60. HL-60 cells (3×10^5 cells/mL) were treated with RBE (10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. The levels of cleaved-caspase-9, cleaved-caspase-3 and PARP were analyzed by western blotting using specific antibodies.

caspase-3는 apoptosis의 실행자로 알려져 있다. caspase-9에 의해 활성화된 caspase-3는 PARP 등 다양한 단백질들을 절단할 수 있다. Caspase에 의한 PARP의 절단은 apoptosis의 대표적인 특징 중 하나이다.¹⁷⁾ HL-60 세포에 미강 추출물을 10, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 처리 후 caspase-3, caspase-9 및 PARP의 발현양상을 확인하였다. 그 결과, caspase-3와 caspase-9의 level이 미강 추출물 농도 의존적으

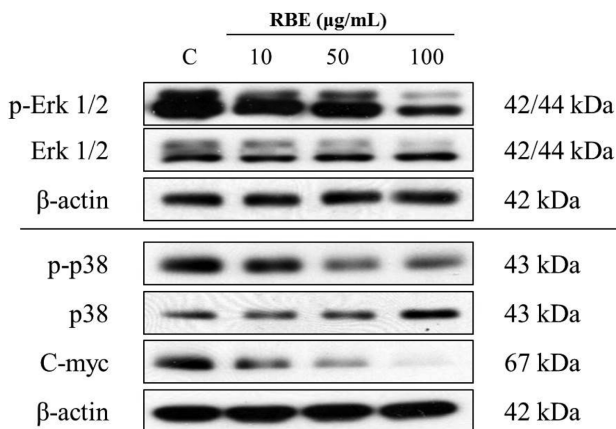


Fig. 6. The effect of rice bran extract (RBE) on the expressions of MAPKs and c-myc in HL-60. HL-60 cells (3×10^5 cells/mL) were treated with RBE (10, 50 and 100 µg/mL) for 24 h. The levels of p38 MAPK, ERK1/2 MAPK and c-myc were analyzed by western blotting using specific antibodies.

로 증가됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 cleaved-PARP의 발현도 증가함을 확인 하였다(Fig. 5). 이와 같은 결과를 미루어 보아, 미강 추출물은 농도의존적으로 caspase-9 및 caspase-3로의 활성화를 촉진하여 PARP의 분해를 이끔으로써, HL-60 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

ERK 1/2 MAPK 및 p38 MAPK 발현 양상의 변화 – MAPK 신호전달 경로는 다양한 세포 신호 전달을 조절하는 핵심 요소로서 세포의 성장, 증식, 분화 및 세포사멸 등 다양한 경로 조절에 관여한다. MAPK의 주요 그룹 중 ERK1/2는 세포분열 촉진인자와 같은 성장인자들에 의해 활성화 되어, 세포 성장, 생존 및 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다. MAPK의 또 다른 주요 그룹인 p38 MAPK는 세포수준에 가해지는 화학, 환경적 스트레스 및 염증성 인자에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 다양한 경로를 통해 활성화된 ERK1/2 및 p38은 핵으로 이동하여 c-myc 및 c-jun과 같은 early response protein의 전사인자로 작용한다.¹⁹⁾ C-myc은 널리 알려진 종양유전자(oncogene)로써, 특히 활성화된 ERK1/2는 c-myc의 안정화를 유도한다고 보고되었다.²⁰⁾ 미강 추출물이 MAPK 경로에 관여하는지 확인하기 위하여 HL-60 세포에 미강 추출물을 10, 50 및 100 µg/mL 농도로 24시간 처리 후 ERK1/2, p38 및 c-myc의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 미강 추출물 농도 의존적으로 ERK1/2 및 p38의 활성화가 억제됨을 확인하였다. 뿐만 아니라, c-myc의 발현도 미강 추출물 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 6). 세포의 미세소관(microtubule)에 결합하여 세포분열의 진행을 억제시키는 항암제인 docetaxel은 LLC1 세포에서 p38의 인산화를 억제함으로써 항암작용을 나타내었다.²¹⁾ 또한, 급성 백혈병 및 일부 고형종양에 사용하는 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids) 계열의 항암제인

vincristine은 hepatocellular cancer cell인 Hep3B에서 phospho-ERK 1/2의 발현 감소를 유도하며 항암작용을 나타냈다.²²⁾ 그리고 항피리미딘제(antiprimidines)로서 피리미딘 대사 경로에서 thymidylate synthase를 억제하는 항암제인 5-fluorouracil은 c-myc의 발현의 억제를 유도하며 항암작용을 나타낸다고 보고되었다.²³⁾ 이상의 결과를 미루어 보아 미강 추출물은 MAPK 신호전달 경로 중 ERK1/2와 p38 MAPK 경로의 활성을 억제시키고, 이로 인해 종양유전자 c-myc의 발현을 억제시켰을 것이라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60에서 미강 추출물의 암세포 증식 억제 효과를 조사하였다. 미강 추출물은 HL-60 백혈병 세포 성장증식을 억제하였으며, 이는 미강 추출물 농도의존적으로 HL-60 세포에서의 Bcl-2의 발현 억제, Bax의 발현 증가, caspase-9와 caspase-3의 활성화 및 PARP의 분해에 의한 apoptosis유도에 의한 것임을 확인하였다. 미강 추출물에 의한 HL-60 세포의 apoptosis 유도는 세포의 성장 등에 관여하는 ERK 1/2 MAPK 및 p38 MAPK 경로 활성 및 c-myc의 발현을 억제에 의한 것으로 사료된다. 이와 같은 연구 결과는 미강 추출물을 급성 전골수성 백혈병의 치료에 이용할 수 있는 가능성의 근거를 제시하는 것이다.

사 사

본 연구는 보건복지부 암정복추진연구개발사업 지원으로 이루어진 것임(과제고유번호: 1120340).

인용문헌

1. 최현임, 이복규, 김수정 (2010) 일반쌀겨와 발효쌀겨의 영양성분에 관한 연구. *韓國食品營養學會誌* **23**: 1-7.
2. Roschek, B. Jr., Fink, R. C., Li, D., McMichael, M., Tower, C. M., Smith, R. D. and Alberte, R. S. (2009) Pro-inflammatory enzymes, cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2, and 5-lipoxygenase, inhibited by stabilized rice bran extracts. *J. Med. Food*. **12**: 615-623.
3. Xu, Z., Hua, N. and Godber, J. S. (2001) Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 2077-2081.
4. Ha, H., Lee, J. H., Kim, H. N. and Lee, Z. H. (2011) α-Tocotrienol inhibits osteoclastic bone resorption by suppressing RANKL expression and signaling and bone resorbing activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **406**: 546-551.

5. Lai, M. H., Chen, Y. T., Chen, Y. Y., Chang, J. H. and Cheng, H. H. (2012) Effects of rice bran oil on the blood lipids profiles and insulin resistance in type 2 diabetes patients. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **51**: 15-18.
 6. Nam, S. H., Choi, S. P., Kang, M. Y., Kozukue, N. and Friedman, M. (2005) Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 816-822.
 7. Leardkamolkarn V., Thongthep W., Suttiarporn P., Kongka-chuichai R, Wongpornchai S., Wanavijitr A. (2011) Chemopreventive properties of the bran extracted from a newly-developed Thai rice: The Riceberry, *Food Chemistry* **125**: 978-985.
 8. Cai, H., Hudson, E. A., Mann, P., Verschoyle, R. D., Greaves, P. and Manson, M. M. (2004) Growth-inhibitory and cell cycle-arresting properties of the rice bran constituent tricin in human-derived breast cancer cells in vitro and in nude mice in vivo. *British Journal of Cancer* **91**: 1364-1371.
 9. Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S. and Gescher, A. (2000) Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. A publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **9**: 1163-1170.
 10. Annual report of cancer statistics in Korea (2011) 보건복지부 중앙암등록본부.
 11. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay. assessment of radiosensitivity. *Cancer Research* **47**: 943-946.
 12. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **139**: 271-279.
 13. Luo, Y. and Kessel, D. (1997) Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochemistry and photobiology* **66**: 479-483.
 14. Bradford, M. M. A (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
 15. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M. and Basi, G. (1994) Apoptosis and the cell cycle. *Cellular & Molecular Biology Research* **40**(7-8): 603-612.
 16. 김해중, 천영진, 김미영 (1999) HL-60 세포에서 Camptothecin의 apoptosis 유도작용. *藥學會誌* **43**: 385-390.
 17. Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C. and Kroemer, G. (2012) Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation Research* **111**: 1198-1207.
 18. Chuang, S. M., Wang, I. C. and Yang, J. L. (2000) Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis* **21**: 1423-1432.
 19. Bassi, R., Heads, R., Marber, M. S. and Clark, J. E. (2008) Targeting p38-MAPK in the ischaemic heart: kill or cure? *Current Opinion in Pharmacology* **8**: 141-146.
 20. Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T. and Ivaldi, G. (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature Cell Biology* **6**: 308-318.
 21. Elsea, C. R., Roberts, D. A., Druker, B. J., and Wood, L. J. (2008) Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PLoS one* **3**: e2355.
 22. Choi, J., Yip-Schneider, M., Albertin, F., Wiesenauer, C., Wang, Y. and Schmidt, C. M. (2008) The effect of doxorubicin on MEK-ERK signaling predicts its efficacy in HCC. *The Journal of Surgical Research* **150**: 219-226.
 23. Zhao, H. Y., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Hara-guchi, M. and Tabata, S. (2008) Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells. *Cancer letters* **270**: 156-163.
- (2013. 4. 23 접수; 2013. 5. 16 심사; 2013. 8. 7 게재확정)