

감마선 조사된 Apigenin의 H1975 인체 비소폐암세포에서의 Apoptosis 유발 효과

박재남¹ · 변의백^{1,3} · 김좌진² · 장범수^{1,3} · 박상현^{1,3}

¹한국원자력연구원 첨단방사선연구소 생명공학연구부

²건양대학교 의과대학

³한국과학기술연합대학원대학교 방사선동위원소 응용 및 생명공학

Induction of Apoptosis by Gamma-Irradiated Apigenin in H1975 Human Non-Small Lung Cells

Jae-Nam Park¹, Eui-Baek Byun^{1,3}, Jwa-Jin Kim², Beon-Su Jang^{1,3}, and Sang-Hyun Park^{1,3}

¹Advance Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute

²Department of Anatomy, College of Medicine, Konyang University

³Department of Radiation Biotechnology and Applied Radioisotope Science, Korea University of Science and Technology

ABSTRACT The objective of this study was to evaluate the anticancer effects of gamma-irradiated apigenin against various human cancer cells. Structural changes were analyzed by high pressure liquid chromatography. Gamma-irradiated apigenin showed a new peak distinguished from the main peak of apigenin (non-irradiated). Cytotoxic effects in human normal cells (HS68) were not observed upon gamma-irradiated and non-irradiated apigenin treatment. However, gamma-irradiated apigenin treatment significantly increased cytotoxicity against non-small lung cancer cells. For apoptosis induction activity tested by Annexin V/PI staining, gamma-irradiated apigenin showed a stronger effect than non-irradiated apigenin, and the level of reactive oxygen species was apparently elevated by gamma-irradiated apigenin treatment. These results suggest that gamma irradiation could be an effective method for development of a new physiological compound from an original compound by inducing structural changes.

Key words: gamma irradiation, apigenin, non-small cell lung cancer, apoptosis, reactive oxygen species

서 론

최근 삶의 질 향상으로 건강에 대한 관심이 높아지고 있으나 세계보건기구의 통계자료에 따르면 전 세계적으로 암으로 인한 사망률이 계속 증가할 것으로 보이며, 가까운 미래에 1,000만 명 이상이 암으로 인해 사망할 것으로 추정하고 있다(1). 우리나라의 경우 암은 남녀 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 2000년 101,772명에서 2010년 202,053명으로 10년 동안 약 100% 증가한 것으로 보고된 바 있다(2,3). 이는 지나치게 서구화된 식문화 및 식습관으로 인하여 비만 인구의 증가 및 심혈관계 질환 등 만성질환의 증가로 볼 수 있다. 다시 말해 암은 현대의학의 발전에도 불구하고 발생률과 사망률이 계속 증가하고 있는 실정이다. 지금까지 암 발생의 원인으로는 유전적 요인과 면역학적 요인, 호르몬 요인, 개인적 스트레스, 담배, 직업성 발암물질, 환경오염 등 다양한 요인들이 관련되어 있다고 알려져 있다(4,5).

최근에는 이러한 암에 대한 예방 및 치료할 수 있는 물질을 식품 중에서 찾는 노력이 많이 이루어지고 있으며, 특히 연구자는 부작용을 최소화하면서 암을 예방 및 치료할 수 있는 새로운 천연물 유래 의약품이나 기능성 식품을 개발하기 위해 항산화, 항염, 항암 등 다양한 생리활성을 갖는 플라보노이드 성분들을 연구하고 있다(6-8). 아피제닌(apigenin)은 flavonoid 계열의 폴리페놀로써 파슬리, 박하, 레몬, 들깨, 딸기 및 다양한 과일에 다량 함유되어 있는 천연 고기능성 성분이다(9). Apigenin의 대표적인 생리활성으로는 활성산소종의 발생을 억제하여 높은 항산화 효과를 나타낸다는 보고가 있으며, 그 밖에도 항염, 항고혈압, 항비만 등의 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되고 있다(10-12).

한편 방사선 조사는 비가열 멸균 처리 방법으로 열변성에 취약한 식품 및 보건의료 제품의 위생학적인 안전성을 높이는 데 주로 사용되며, 최근에는 방사선의 높은 에너지를 생물소재에 적용하여 유효 성분의 추출을 개선 및 유효성분의 구조 변화에 따른 생리활성 증가로 인한 고부가가치 생물소재 개발에 관한 연구가 진행된 바 있다(13,14). 다당류(polysaccharide)에 방사선을 조사할 경우 당(glucose)과 당 사이를 연결해주는 글리코시드 결합(glycosidic bond)의 절단에 의해 다당류의 저분자화가 유도되고 이렇게 저분자화된

Received 17 December 2014; Accepted 21 April 2015

Corresponding author: Sang-Hyun Park, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup-si, Jeonbuk 580-185, Korea
E-mail: parksh@kaeri.re.kr, Phone: +82-63-570-3370

다당류들은 소장에서 흡수가 증가되어 높은 생리활성을 나타낸다고 보고되고 있으며, 효소 및 산 가수분해에 의한 저분자화 방법에 비해 매우 효율이 높은 것으로 알려져 있다(15,16). 또한 단백질의 경우 방사선 조사에 의해 구조가 변형되어 알레르기원성이 감소되며, 독성 단백질의 경우 그 독성이 감소되는 것으로 알려져 있다(17,18). 그러나 방사선 조사에 따른 폴리페놀 성분의 구조 변환 연구에 관해서는 아직까지 많은 연구가 진행되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 폴리페놀류의 방사선 조사에 따른 구조 변화 및 생리활성 변화를 관찰하기 위하여 flavonoid 계열의 폴리페놀인 apigenin에 방사선을 조사하여 다양한 암세포에 관한 항암 효과에 관하여 평가하였으며, 나아가 방사선 구조 변환 연구를 통해 방사선을 이용한 새로운 신약 개발 가능성을 제시하는 기초자료를 제공하고자 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 감마선 조사

본 실험에 사용된 apigenin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)은 순도 99.9% 이상을 구매하여 사용하였다(Fig. 1).

시료의 감마선 조사는 선원 11.1 pBq, Co-60 동위원소를 사용하는 감마선 조사시설(IR-221 gamma irradiator, MDS Nordion, Ottawa, Canada)을 이용하여 실온(20±2°C)에서 시간당 10 kGy의 선량률로 조사하여 흡수선량이 각각 30, 50 및 100 kGy가 되도록 하였으며 흡수선량 확인은 방사선 선량계(Ceric-Cerous Dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하여 총 흡수선량 오차를 계산하였다. Dosimeter 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 ±5% 이내였다.

Apigenin의 HPLC 분석

감마선 조사된 apigenin의 구조 변화에 관하여 분석하기 위하여 HPLC system을 이용하였다. 사용한 HPLC(Alliance HPLC system, Mo. 2690, Milford, MA, USA) 장치의 DAD(Diode Array Detector)를 사용하였으며, 칼럼은 Agilent Eclipse XDB-C18(4.6 mm×150 mm, 5 µM)을 사용하였다. 이동상은 A : B=methanol : 0.1% formic acid를 사용하

였으며, 온도는 35°C를 유지한 상태에서 유속 0.8 mL/min으로 하였다. 이동상 용매로는 MeOH(100%)에서 0.1% formic acid(100%)의 조성으로 45분간 변화시켜 분석하였다.

Apigenin의 정상세포 독성 및 암세포 독성 평가

감마선 조사된 apigenin의 정상세포주 및 다양한 암세포주에 대한 세포 독성을 확인하기 위하여 정상세포주로는 인체유래 섬유육종세포(HS68)를, 암세포주로는 혈구암(THP-1), 직장암(SW 480R), 유방암(MDA MB 231), 위암(AGS), 대장암[HCT 116+ (p55 wild type and p53 mutant)] 및 폐암(PC 9 and H1975) 세포주를 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. HS 68 세포는 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin(Gibco, Gaithersburg, MD, USA) 항생제와 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Logan, UT, USA)이 함유된 RPMI 1640, DMEM(Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하면서 사용하였다. 인체유래 6종 암세포주의 경우 10% FBS, 1% antibiotic(100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)을 첨가한 RPMI 1640 또는 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포 독성을 평가하기 위하여 정상세포주 및 다양한 조직기원의 암세포주를 96-well plate(Corning Inc., Lowell, MA, USA)에 2×10⁴ cell/mL가 되도록 90 µL씩 분주하여 4시간 동안 완전히 부착시킨 후, 50 kGy 조사된 apigenin을 각각 12.5, 25, 50 및 100 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 다음 세포 독성을 확인하였다. 세포 독성의 확인은 Carmichael 등(19)의 방법을 응용하여 측정하였다. 각각의 정상세포주 및 암세포주를 시료와 함께 24시간 배양한 후 각 well에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 시약(5 mg/mL)을 30 µL씩 넣고 2시간 동안 CO₂ incubator에서 반응시키고 배양 상등액을 제거하였다. MTT 시약의 첨가에 의해 형성된 formazan의 녹이기 위하여 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 첨가하고 30분 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Annexin V/PI 이중염색을 통한 형광의 관찰

비소폐암세포 H1975(2×10⁶ cells/well)를 96 well cell culture plate에 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 50 kGy로 방사선 조사된 apigenin을 25 및 50 µM 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Cell을 trypsin-EDTA 처리하여 conical tube에 모은 뒤 FACS용 PBS로 두 번 washing 하고 원심분리 하였다. 생성된 pellet을 1×binding buffer를 이용해 풀어준 뒤 annexin V-FITC와 PI 시약으로 실온의 암소에서 15분간 staining 하고 형광을 관찰하였다.

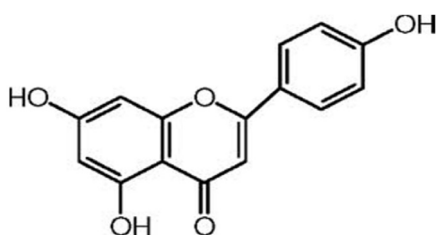


Fig. 1. Molecular structure of apigenin.

폐암세포 내 활성산소종(ROS, reactive oxygen species) 측정

비소폐암세포(H1975) 내 활성산소종은 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate(DCFH-DA) assay로 측정하였다(20). DCFH-DA(Sigma-Aldrich Co.)는 세포 내 활성산소와 반응하여 형광물질(dichlorofluorescein, DCF)을 만들어 내는 것으로, 이 시약을 세포에 처리하여 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내 활성산소종을 측정할 수 있다. 세포를 96 well plate에 2×10^4 cell/mL의 농도로 분주하여 24시간 배양하고 PBS로 3회 세척한 다음, 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후 상등액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 50 μ M H₂O₂를 처리하여 시간대별 DCF fluorescence를 측정하였다. Control군은 apigenin 대신 PBS를 처리하였으며, 실험군은 50 kGy로 방사선 조사된 apigenin을 각각 25 및 50 μ M 처리하고 2, 4, 6시간에 각각 ROS 생성 유무를 관찰하였다.

통계처리

모든 실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 오차를 결과로 나타내었고, 이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Science(Ver. 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Student's two tailed t-test로 $P < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

감마선 조사된 apigenin의 구조 변화

감마선 조사에 따른 apigenin의 구조 변화를 확인하기 위하여 감마선 조사된(30, 50, 100 kGy) apigenin과 비조사된(0 kGy) apigenin의 HPLC peak를 비교하여 Fig. 2에 나타내었다. Apigenin에 대한 최적 분석과장을 선택하기 위해서 200 nm에서 400 nm까지 HPLC-DAD로 스캔한 결과

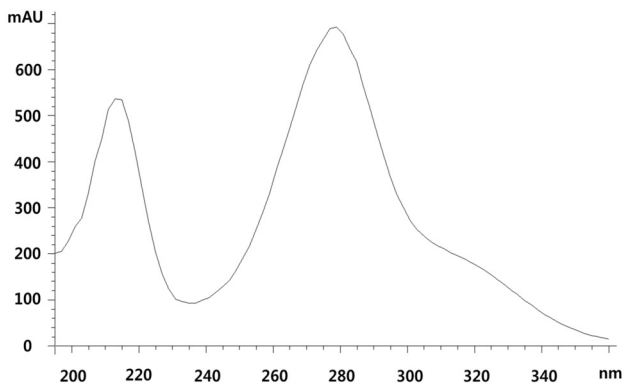


Fig. 2. HPLC chromatogram of UV spectrum, apigenin was detected by Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ M) and the mobile phase consisted of 0.1% formic acid water. The flow rate was 1 mL/min and the detection wavelength was set at 200 to 340 nm.

280 nm가 최대 흡수과장으로 확인되어 이를 최적 분석과장으로 선택하였다(Fig. 2). 비조사된(0 kGy) apigenin의 경우 단일 main peak를 확인할 수 있어 apigenin의 순도가 실험에 사용되기에 적절한 것으로 판단되었다(Fig. 3). 30 kGy 감마선 조사구의 경우 radiolysis peak들이 확인되었으나 100 kGy 선량으로 조사된 실험구의 경우 감마선 조사에 의해 대부분 분해되어 peak를 확인할 수 없었다. 반면 50 kGy 선량으로 조사된 apigenin의 경우 감마선 조사에 의해 3개의 새로운 peak들이 생성되는 것을 알 수 있었다. 이는 감마선 조사에 의해 apigenin의 구조(Fig. 1) 상 이중 결합을 갖고 있는 부분의 한 곳에 methyl가 치환된 것으로 사료되었으며, H-NMR 및 C-NMR을 통해 명확한 구조분석이 필요할 것으로 판단하였다. 이러한 결과는 Sung 등(21)의 연구에서 아이소플라본 화합물 중 하나인 genistein에 감마선(50, 100, 150 kGy)을 조사하여 radiolytic peak를 확인한 연구 결과와 비슷한 경향을 보였다. 또한 감마선 조사된 genistein의 radiolysis 화합물을 분획하여 항산화 활성을 평가한 결과 비조사 실험구에 비해 높은 활성을 보였다는 연구가 보고된 바 있다(22). 따라서 apigenin에 감마선을 조사할 경우 감마선 조사선량에 의존적으로 apigenin의 main peak가 점점 사라지면서 새로운 radiolytic peak가

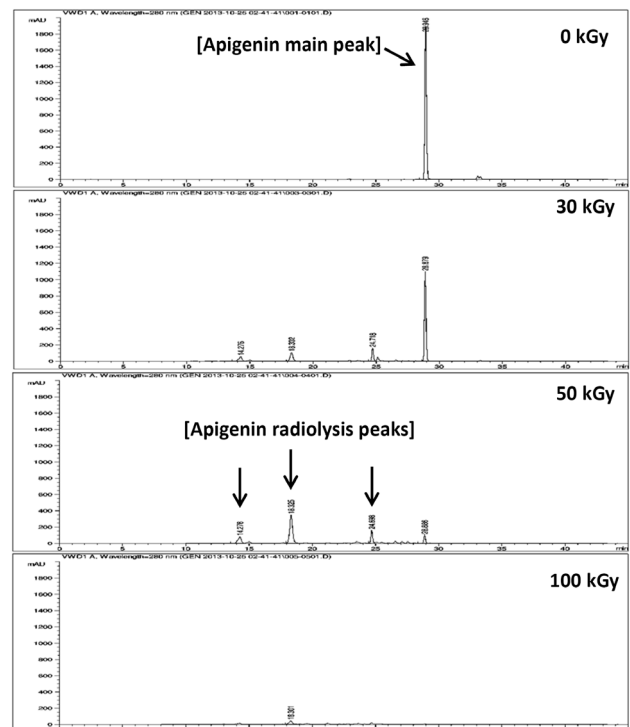


Fig. 3. Chemical structure of apigenin used in the study. Structural analysis of gamma-irradiated and non-irradiated apigenin. Apigenin was gamma-irradiated at the doses of 0 kGy, 30 kGy, 50 kGy, and 100 kGy, respectively, and structural change was detected by HPLC gamma-irradiated apigenin was detected by Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ M) and the mobile phase consisted of 0.1% formic acid water. The flow rate was 1 mL/min and the detection wavelength was set at 280 nm.

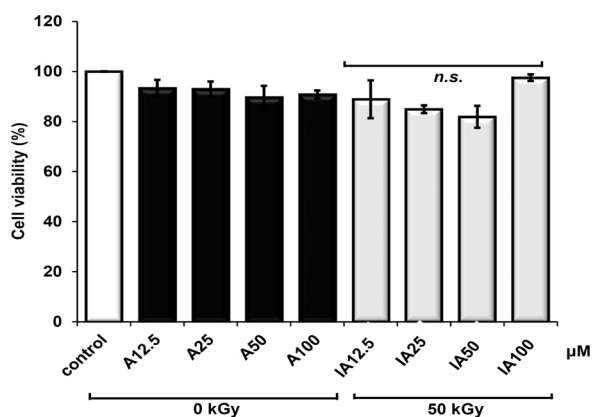


Fig. 4. Cytotoxic effects of non-irradiated apigenin (A) and irradiated apigenin (IA) in methanol on the proliferation of human skin-derived primary fibroblast cell. HS68 cells were treated with non-irradiated (12.5, 25, 50, and 100 μM) and irradiated apigenin (12.5, 25, 50, and 100 μM) for 24 h, and the cell viability was determined by MTT assay as described in Methods. Significant differences between control and gamma-irradiated apigenin groups were evaluated by unpaired Student's t-test. n.s. denotes no significance.

증가하는 것을 알 수 있었고, 50 kGy의 선량으로 조사된 apigenin의 경우에서 radiolytic peak의 양이 가장 크게 증가하였다. 따라서 radiolytic peak의 생성에 따른 항암 활성의 변화에 대해 관찰하기 위하여 비조사구(0 kGy)와 50 kGy apigenin에 의하여 나타나는 항암 활성의 변화에 대한 연구를 진행하였다.

감마선 조사된 apigenin의 정상세포 및 암세포 독성에 미치는 영향

Apigenin의 감마선 유도 화합물이 가장 많이 생성되는 선행연구 결과를 바탕으로 apigenin에 50 kGy 수준으로 감마선을 조사한 후 이에 따른 HS68 정상세포의 세포 독성 (Fig. 4)과 다양한 암세포에 대한 독성평가 결과를 Fig. 5에 나타내었다. HS68 정상세포에 감마선 조사 및 비조사된 apigenin을 각각 12.5, 25, 50, 100 μM 농도로 처리한 후 MTT assay를 통하여 세포 독성에 관하여 평가한 결과 모든 실험구에서 유의적인 세포 독성이 나타나지 않았다. 따라서 감마선 조사 및 비조사된 apigenin의 처리는 정상세포에 대

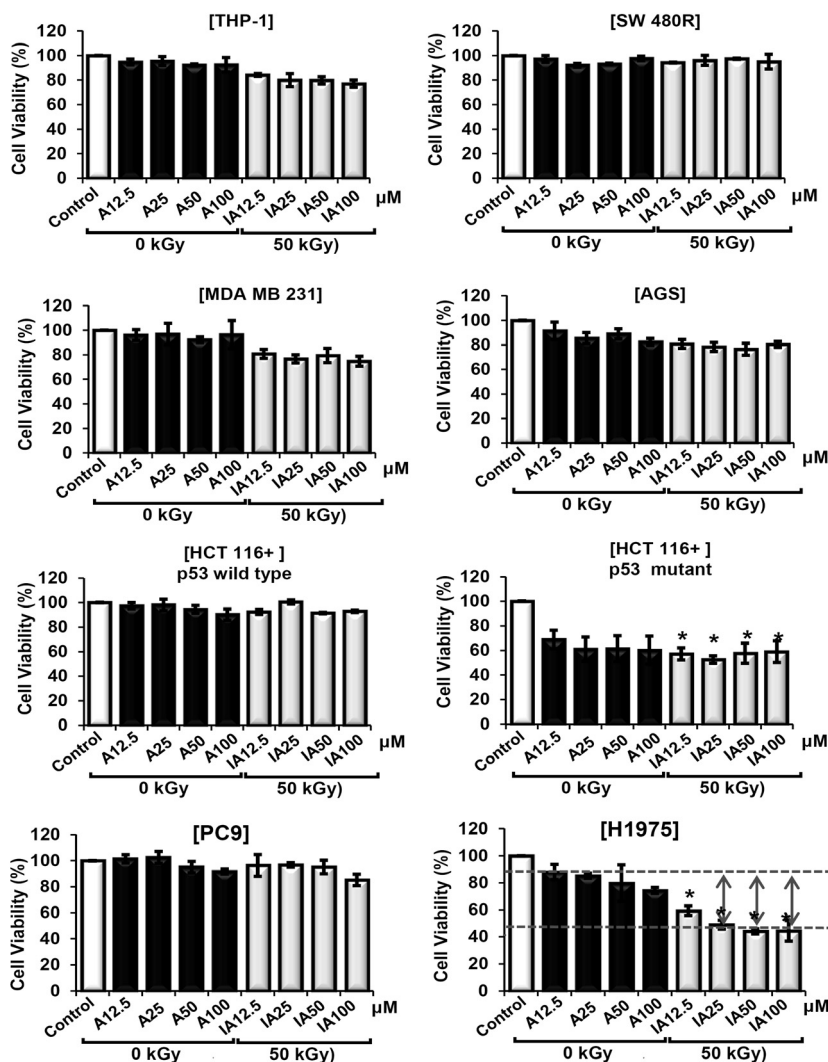


Fig. 5. Cytotoxic effects of non-irradiated apigenin (A) and irradiated apigenin (IA) in methanol on the proliferation of various human carcinoma cells such as THP-1, SW 408R, MDA MB 231, AGS, HCT 116+ (wild type), AGS HCT 116+ (mutant type), PC9 and H1975. All cells were treated with non-irradiated (12.5, 25, 50, and 100 μM) and irradiated apigenin (12.5, 25, 50, and 100 μM) for 24 h, and the cell viability was determined by MTT assay as described in Methods. The results are expressed as mean±SEM (n=3). *P<0.05 vs control by unpaired Student's t-test.

한 세포 독성을 일으키지 않는 것으로 판단하였다. 그러나 향후 다양한 정상세포 및 동물실험을 통한 독성평가가 필요할 것으로 사료되었다. 유방암(MDA MB 231), 위암(AGS), 대장암[HCT 116+ (p53 wild type and p53 mutant)] 및 폐암(PC 9 and H1975) 등 기원 조직별 암세포에 감마선 조사 및 비조사된 apigenin을 12.5, 25, 50, 100 μ M 농도로 처리하여 세포 독성에 관하여 평가한 결과(Fig. 4) 대장암(HCT 116+ p53 mutant type)세포에서 감마선 조사의 유무와 상관없이 세포 독성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). Apigenin은 일반적으로 방향족 화합물의 하나로써 파슬리, 양파, 오렌지, 차, 카모마일, 밀 등에 다량 함유되어 있으며, 주로 과일과 같은 열매 부분에 다량 분포하는 특징을 가지고 있고 대장암 등 여러 가지 인체 암세포의 세포성장 저해, 세포주기 억제 및 세포자살(apoptosis)을 유도하는 것으로 알려져 있다(23,24). 또한 인체 간암세포에서 apigenin에 의한 TRAIL 유도 apoptosis의 증진 효과 연구에서도 항암 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(1). 본 연구에서도 기존의 결과와 유사하게 대장암에 대한 세포 독성이 높게 유지되는 것으로 나타났으나 감마선 조사 및 비조사구에 대한 세포 독성의 차이는 나타나지 않았다. 반면 폐암(H1975) 세포주의 세포 독성 실험 결과의 경우 다른 암세포의 세포 독성 결과와 비교해 볼 때 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다. 즉 감마선 조사된 apigenin의 처리가 비조사된 apigenin의 처리보다 유의적($P < 0.05$)으로 높은 암세포 독성을 나타내는 것으로 나타났다. 이는 항암 효과가 있는 apigenin에 감마선 조사를 할 경우 H1975 세포주에 특이적으로 반응할 수 있는 구조적 변화가 생기는 것으로 판단하였으며, 명확한 구조분석을 위해 H-NMR 및 C-NMR 연구가 수행되어야 할 것으로 사료되었다.

최근 방사선 조사가 식품/생물소재의 구조 변환, 불용/유해물질 제거 및 기능성 향상 등 생물소재 활용 연구의 중요한 기술로서 평가되어 방사선/생명 공학 융합 기술을 활용한 천연 식의약품 소재 개발의 산업화가 빠르게 진행되고 있는 것으로 비춰볼 때 의미 있는 결과로 판단하였다(13,14). 또한 감마선 조사에 의해 apigenin의 암세포 독성이 증가되는 것은 감마선 조사에 의한 apigenin의 구조 변화에 따른 영향이라고 사료되었으며, 이러한 연구는 새로운 바이오 소재 및 신약 개발 측면에서 방사선 조사기술의 가능성을 제시하는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단하였다.

감마선 조사된 apigenin의 apoptosis 유도 관찰

감마선 조사에 의해 유도된 apigenin 화합물이 폐암(H1975)세포에서 apoptosis를 유도하는지를 알아보기 위해 25, 50 μ M 처리하여 24시간 후 Annexin V/PI 염색을 통해 apoptosis 발현 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 앞서 관찰되었던 세포 활성의 결과와 동일하게 Annexin V/PI 염색에서도 감마선 조사된 apigenin 처리구에서 apoptosis의 발현을 확인할 수 있었다. 즉 세포사멸을 유발시키는 것이 피사가 아

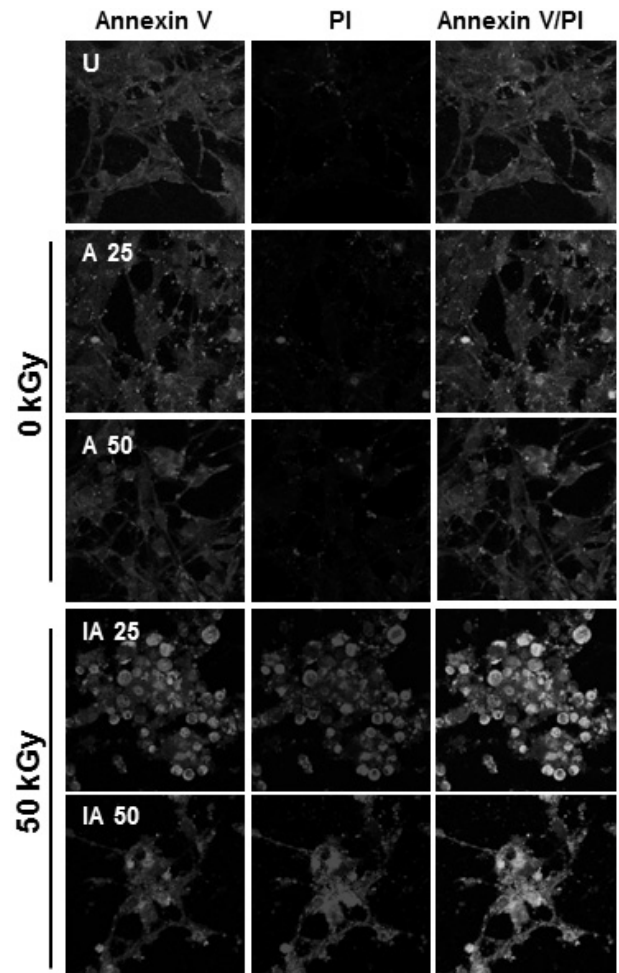


Fig. 6. Visualizing confocal microscopy test of apoptosis in the non-small cell lung carcinoma (H1975) cell. Untreated (U), non-irradiated apigenin (A), irradiated apigenin (IA). H1975 cells were treated with non-irradiated (25 and 50 μ M) and irradiated apigenin (25 and 50 μ M) for 24 h, and the Annexin V/PI was determined by visualizing confocal microscopy test as described in Methods.

닌 apoptosis에 의한 것임을 본 연구에서 Annexin V/PI 염색을 통하여 가능성을 확인하였으며, 감마선 조사된 apigenin 처리가 산화적 스트레스를 유발해 암세포의 apoptosis를 발현시키는 것에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단하였다. 이상의 연구를 종합하여 볼 때 apigenin 유도 화합물이 폐암세포에 대한 항암 효과를 나타내는 것은 화합물 속에 있는 구조 변환된 apigenin 유도체일 것으로 사료되며 향후 이물질을 정제하여 구조 분석하는 등 명확히 규명할 필요가 있는 것으로 판단하였다.

감마선 조사된 apigenin의 활성산소종 생성 관찰

감마선 조사에 의해 유도된 apigenin 화합물이 폐암(H1975)세포주 내 활성산소종 생성 효과에 대한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 감마선 조사된 apigenin을 25, 50 μ M 처리한 후 2, 4, 6시간 후에 형광시킨 후 ROS 발현 유무를 확인

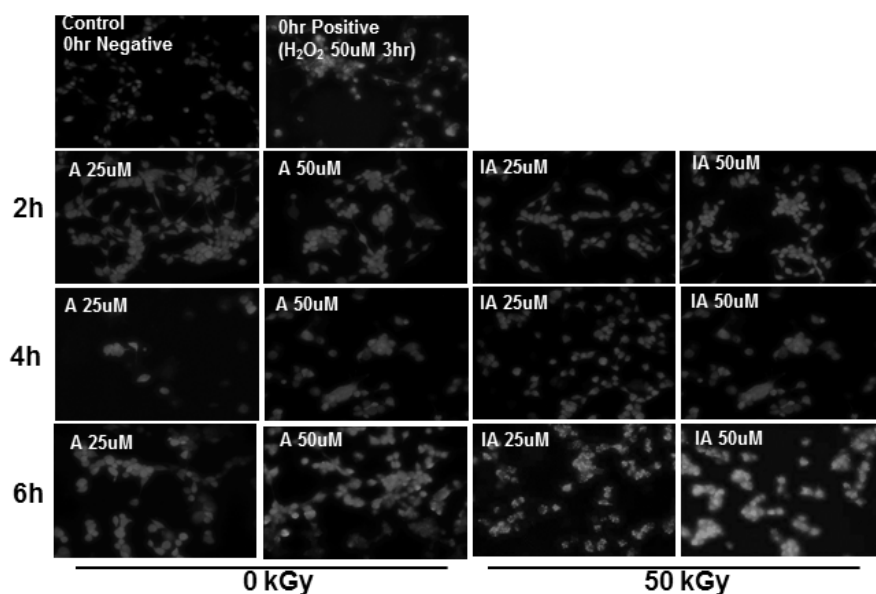


Fig. 7. Effects of non-irradiated apigenin and irradiated apigenin on reactive oxygen species in the non-small cell lung carcinoma (H1975) cell. Non-irradiated apigenin (A), irradiated apigenin (IA). H1975 cells were treated with non-irradiated (25 and 50 μ M) and irradiated apigenin (25 and 50 μ M) for 2, 4, and 6 h, and the reactive oxygen species (ROS) was determined by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay as described in Methods.

하였다. 감마선 비조사된 실험구의 경우 25 μ M에서는 시간에 관계없이 ROS 발현이 미미하였으나, 50 μ M에서는 6시간 후 ROS 생성을 관찰할 수 있었다. 반면 감마선 조사된 실험구의 경우 4, 6시간 후에 농도 의존적으로 ROS가 발현되는 것으로 나타나 apigenin 유도 화합물이 폐암세포주에 항암 활성을 나타내는 것으로 사료되었다. ROS는 superoxide를 비롯하여 hydrogen peroxide, hydroxyl radical, 알킬 과산화물 등을 포함하고 구조적으로 하나의 부대 전자를 가지므로 반응성이 매우 크고 불안정한 화합물로 알려져 있다(25). 또한 일반적으로 ROS는 정상세포에 손상을 주지만 암세포 내에서는 apoptosis signaling kinase 1(ASK1)/mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호경로를 통하여 초기 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려져 있다(26). 따라서 이상의 연구 결과는 감마선을 이용하여 apigenin 유래 새로운 유도 화합물 소재를 찾아내는 것으로 항폐암 연구의 기초자료가 될 수 있을 것으로 판단하였다.

요 약

본 연구는 감마선 조사에 의해 유도된 apigenin 화합물 (radiolysis products)이 인체유래 다양한 암세포에 처리했을 때의 항암 효과를 알아보기 위하여 실험을 진행하였다. Apigenin을 50 kGy로 조사할 경우 유도 화합물이 생성됨을 확인할 수 있었으며, radiolysis 화합물을 분획하여 인체유래 섬유육종세포(HS68)에 대한 독성을 평가한 결과 독성이 없는 것으로 나타났다. 다양한 암세포에 항암 활성을 평가한 결과 폐암(H1975)세포주의 경우 다른 암세포에 비해 효과가 높은 것으로 나타났다. Annexin V/PI 염색을 통해 감마선 조사된 apigenin 처리구에서 apoptosis의 발현을 확인할 수 있었으며, ROS(reactive oxygen species) 평가 결과에서도 농도 의존적으로 발현을 확인할 수 있었다. 본 연구는

방사선 구조 변환 연구를 통해 방사선을 이용한 새로운 신약 개발 가능성을 제시하는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단하였다.

감사의 글

이 논문은 미래창조과학부에서 시행하는 방사선기술개발사업(2012M2A2A6011335)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Kim EY, Kim AK. 2011. Enhancement of TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by apigenin. *Yakhak Hoeji* 55: 49-55.
- National Cancer Information Center. 2013. Cancer incidence rate. http://www.cancer.go.kr/mbs/cancer/subview.jsp?id=cancer_040101000000 (accessed Sep 2014).
- Statistics Korea. 2014. Causes of death statistics in Korea, 2012. http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2770 (accessed Feb 2015).
- Kim SS. 1998. A study on the related factors of Korean cancer-outbreaks. *J Korean Soc Health Statistics* 23: 1-16.
- McIntire SN, Cioppa AL. 1984. *Cancer nursing: A developmental approach*. Wiley, New York, NY, USA. p 557-571.
- Kühnau J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191.
- Rhim TJ, Choi MY. 2011. The antioxidative effects of *Rhododendron brachycarpum* extracts. *Korean J Plant Res* 24: 456-460.
- Yoon JA, Hahm SW, Park J, Son YS. 2009. Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of *Opuntia humifusa* and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1679-1684.
- Peterson J, Dwyer J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res* 18: 1995-2018.
- Li RR, Pang LL, Du Q, Shi Y, Dai WJ, Yin KS. 2010.

- Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32: 364-370.
11. Shukla S, Gupta S. 2010. Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res* 27: 962-978.
 12. Long X, Fan M, Bigsby RM, Nephew KP. 2008. Apigenin inhibits antiestrogen-resistant breast cancer cell growth through estrogen receptor- α dependent and estrogen receptor- α -independent mechanisms. *Mol Cancer Ther* 7: 2096-2108.
 13. Byun EH, Kim JH, Sung NY, Choi JI, Lim ST, Kim KH, Yook HS, Byun MW, Lee JW. 2008. Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of β -glucan. *Radiat Phys Chem* 77: 781-786.
 14. Kim JK, Sung NY, Srinivasan P, Choi JI, Kim SK, Oh JM, Kim JH, Song BS, Park HJ, Byun MW, Lee JW. 2008. Effect of gamma irradiated hyaluronic acid on acetaminophen induced acute hepatotoxicity. *Chem Biol Interact* 172: 141-153.
 15. Ananthaswamy HN, Vakil UK, Sreenivasan A. 1970. Effect of gamma radiation on wheat starch and its components. *J Food Sci* 35: 795-798.
 16. Charlesby A. 1981. Crosslinking and degradation of polymers. *Radiat Phys Chem* 18: 59-66.
 17. Byun MW, Seo JH, Kim JH, Kim MB, Oh NS, Lee JW. 2004. The comparison of a conformational alteration of ovalbumin irradiated with radiation of gamma and electron beam. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1169-1174.
 18. Lee JW, Kim JH, Sung CK, Kang KO, Shin MG, Byun MW. 2000. The changes of allergenic and antigenic properties of major allergen (Pen a 1) of brown shrimp (*Penaeus aztecus*) by gamma irradiation. *Korean J Food Sci Technol* 32: 822-827.
 19. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
 20. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5: 227-231.
 21. Sung NY, Byun EB, Song DS, Jin YB, Park JN, Kim JK, Park JH, Song BS, Park SH, Lee JW, Kim JH. 2014. Anti-inflammatory action of γ -irradiated genistein in murine peritoneal macrophage. *Radiat Phys Chem* 105: 17-21.
 22. Jung HJ, Park HR, Jung U, Jo SK. 2009. Radiolysis study of genistein in methanolic solution. *Radiat Phys Chem* 78: 386-393.
 23. Wang C, Kuzer MS. 1997. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer* 28: 236-247.
 24. Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. 2000. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 28: 102-110.
 25. Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. 2005. Oxidative stress profiling: Part II. Theory, technology, and practice. *Ann N Y Acad Sci* 1055: 136-158.
 26. Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, Chanvorachote P, Rojanasakul Y. 2006. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1062-1069.