

Anticancer Effect of Citrus Fruit Prepared by Gamma Irradiation of Budsticks

Ji Hye Kim¹ and Min Young Kim^{1,2*}

¹Toxicology Laboratory, Major in Biomaterials, College of Applied Life Science, SARI, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received June 9, 2015 / Revised July 15, 2015 / Accepted July 27, 2015

Citrus mutant fruits were induced by irradiation of citrus budsticks with 120 Gy of cobalt (⁶⁰Co) gamma irradiation. The citrus mutant inhibited the growth and induced apoptosis in various human cancer cells, including A549, HepG2, HCT116, MCF-7, and HeLa. The results of a trypan blue exclusion assay showed that citrus mutant fruits exhibited excellent antiproliferation activity in various human cancer cells and low cytotoxicity in normal 16HBE140- and CHANG cells. In addition, the cell death induced by the citrus mutant fruits was associated with an increased population of cells in sub-G1 phase, and it caused DNA fragmentation in human lung adenocarcinoma A549 and hepatocellular carcinoma HepG2 cells. It also up-regulated the amount of cellular nitric oxide (NO[•]) produced as a result of nitric oxide synthase (NOS) activation and suppressed the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in A549 and HepG2 cells. These findings indicate that the citrus mutant fruits activates the NO[•]-mediated apoptotic pathway in A549 and HepG2 cells. It may merit further investigation as a potential chemotherapeutic and chemopreventive agent for the treatment of various types of cancer cells. The results provide important major new insights into the mechanisms of the anticancer activity of citrus mutant fruits.

Key words : Apoptosis, citrus mutant fruits, human cancer cells, nitric oxide

서 론

전세계적으로 암으로 인한 사망 빈도는 통계학적으로 매년 증가하는 추이를 보이며, 국내에서도 질병으로 인한 사망원인의 1위를 차지하는 주요한 질환이다. 특히 인체 암 중 폐암과 간암은 발병률과 치사율이 가장 높은 암으로 우리나라에서도 위험 비중이 급격히 증가하고 있는 추세이다. 역학조사 통해 밝혀진 바에 의하면 산업의 발달과 식생활의 서구화에 따라 우리나라 폐암과 간암의 발생률이 증가하는 것으로 추정되나 이에 대한 정확한 발생원인은 밝혀지지 않고 있다. 폐암과 간암 환자 중 외과적 수술을 통한 절제가 가능한 환자는 30% 내외로 추산되며 수술 후 생존율이 낮아 좋은 예후를 기대하기 어려운 실정으로 절제술을 시행할 수 없는 환자는 전신적인 화학 및 방사선요법을 적용하게 된다. 항암화학요법은 암의 종류나 병기에 관계없이 시행할 수 있다는 유용성을 지니고 있으나 암세포에 대한 특이성이 낮아 감수성이 감소된 내성세포의 출현 및 정상세포에 대한 부작용이 문제로 대두되고 있으며, 이를 보완하기 위해 여러 가지 천연 식물 소재를 이용

한 항암 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있는 실정이다.

Apoptosis는 Programed cell death라는 별칭처럼 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적 요인에 노출된 후 체계적인 신호전달을 통해 죽음에 이르게 되는 정교한 세포의 방어기전이다. 즉, apoptosis의 실패는 암화 과정 및 종양 진행의 원인이 될 수 있기 때문에 apoptosis 조절은 암 치료의 주요한 표적으로 주목 받고 있다. 일반적으로 apoptosis는 extrinsic과 intrinsic pathway로 구별되며, extrinsic pathway는 death receptor에 특정 ligand가 결합함으로써 개시되어 caspase cascade에 의해 DNA 단편화 및 apoptosis를 야기하고, intrinsic pathway는 Bcl-2 family, inhibitor of apoptosis protein (IAP) family의 비활성화가 mitochondrial dysfunction을 중심으로 한 apoptosis를 초래하게 된다. IAP family는 cysteine-containing aspartate-specific protease family인 caspase-3, -7, -9과 결합하여 이들을 불활성화시킴으로써 Bcl-2 family에 의해 조절된 apoptosis를 억제하며, 사람에서 8개의 IAP (NIAP, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, survivin, apollen, livin, ILP-2)가 존재하는 것으로 알려져 있다[4, 37, 40].

한편, intrinsic pathway는 약물, 방사선, reactive oxygen species (ROS) 또는 reactive nitrogen species (RNS) 등의 물리, 화학적 자극에 의해 활성화되기도 하며, RNS의 주요 원인 분자인 nitric oxide (NO[•])는 3가지 nitric oxide synthase (NOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 물질로 생체 내에 존재하는 superoxide anion (O₂⁻)과 반응하여

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3349, Fax : +82-64-756-3351

E-mail : jeffmkim@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

peroxynitrite (ONOO) 등 반응성이 큰 free radical을 유리시킴으로써 주변 조직에 대한 강한 조직 파괴력을 나타낸다. 뿐만 아니라 체내 항산화계(SOD: superoxide dismutase, CTA: catalase, GPx: glutathione peroxidase)에 의해 소거되지 못한 NO[•]의 과다 축적은 mitochondria의 기능 상실, 핵의 응축, DNA 단편화 등을 야기하며 암세포의 세포사멸을 유도하는 역할을 한다[15, 16].

제주지역을 주력시장으로 생산되고 있는 감귤은 재배면적의 확대와 생산량 급증으로 인한 가격경쟁력 확보와 한중 FTA 등 시장개방 확대 대응 방책의 일환으로 감귤 원료의 가공품 생산과 새로운 고부가가치 품종 개발이 이루어지고 있다. 현재까지 감귤류에는 polyphenol, flavonoid, carotenoid, limonoid 등 약 60여 종의 기능성 성분이 함유되어 있는 것으로 밝혀져 있으며, 이들의 항산화, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 면역증강 등 다양한 생리활성 작용이 보고된 바 있다[34, 38]. 감마선 조사법은 오랜 연구를 통해 그 안정성이 일반적으로 받아들여지고 있어 식품 소재의 돌연변이 유발을 통해 저장, 영양 및 관능상 품질 개선 등 고부가가치 작물 생산이 이루어지고 있다. 감마선 조사법을 통한 감귤 신품종 개발은 고당도, 저산도 품종 생산 및 내한성, 크기, 과중, 색깔, 고기능성 성분 함량 품종 뿐 아니라 용이한 유통, 저장을 위한 부패 지연 등의 노력이 지속되어 왔으며[20], 그 중 본 연구진의 선행연구 결과에서 2년 연속 착과되어 안정적인 돌연변이 형질 발현이 관찰된 감귤 돌연변이에 다양한 약리작용을 하는 phytochemical이 다량 함유되어 있어 DPPH, superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide radical scavenging activity 및 ferrous ion chelating 효과가 방사선 무처리군과 비교할 때 뛰어난 것으로 조사되어 있다는 점에서 미루어 보아 암의 예방과 치료에 유효할 것으로 추정된다[27, 28].

따라서 본 연구에서는 궁천조생 품종에서 유래된 방사선 감귤 돌연변이 추출물을 이용하여 *in vitro*에서 다양한 암세포에 대한 항암 제제로써의 활용 가능성을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

시료준비

제주대학교 방사선응용과학연구소의 방사선 조사시설(⁶⁰Co)을 이용하여 궁천조생(*Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa-wase)의 가지(접수)의 눈에 방사선을 조사하여 돌연변이를 유도하였다[20]. 돌연변이 가지에서 착과된 감귤 과실을 24시간 동안 동결건조 과정을 거쳐 분쇄한 후, 5 g/100 ml의 농도가 되도록 100% methanol을 첨가하여 25°C, 150 rpm으로 72시간 동안 교반하여 유효성분을 추출하였다. 추출액을 1,500 rpm에서 15분 간 원심분리 시키고 0.45 μm의 여과 필터로 걸러내어 부유성분을 제거하였으며, 감압 농축을 통하여 얻어낸 고형성분을 다시 동결 건조시켜 보관하였다. 실험 시에는

dimethyl sulfoxide (Amresco, Solon, Ohio, USA)를 이용하여 200 mg/ml의 농도로 stock solution을 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

실험재료

세포 배양에 사용된 Ham's F-12와 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)은 Lonza (Walkersville, MD, US), Minimum essential medium eagle (MEM)은 Sigma (St. Louis, MO, USA), McCoy's 5A medium은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 각각 구입하였으며, 세포생존율 측정에 이용된 trypan blue solution은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포주기 분석을 위해 필요한 RNase는 Amresco (Solon, Ohio, USA)에서, propidium iodide (PI)와 DNA 분절 검사에 이용된 genelute™ mammalian genomic DNA miniprep kit 및 ethidium bromide (EtBr), nitrite 생성량 측정을 위한 griess reagent는 Sigma에서 구입하여 사용하였으며, total RNA 분리를 위한 TRI reagent는 Sigma, TOPscript™ one-step RT PCR kit는 Enzynomics (Daejeon, Korea)사의 제품을 이용하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 HCT116 (인간대장암세포)는 McCoy's 5A medium, A375 (인간흑색종세포), Hela (인간자궁경부암세포), MCF-7 (인간유방암세포)은 DMEM, A549 (인간폐암세포)은 Ham's F-12, HepG-2 (인간간암세포)는 MEM 배지에서 배양하였으며, 정상세포주 16HBE140- (인간폐세포), CHANG (인간간세포)은 각각 DMEM/F-12, DMEM 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin과 L-glutamine을 첨가하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양용기의 80% 정도 증식하였을 때 적정수의 세포를 유지하기 위하여 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였고 배양액은 3-4일마다 교환하였다.

세포생존율 측정

세포 생존율 측정은 Kim 등[25]의 방법을 변형하여 조사하였다. 6 well plate에 세포를 2×10⁶ cells/well이 되도록 분주하고 감귤 돌연변이 추출물을 농도별로 처리한 후 세포배양액과 0.4% trypan blue를 동량으로 넣어 hemacytometer를 이용하여 세포의 증식 정도를 광학현미경으로 관찰하였다. 측정은 모두 세 번 이루어졌으며, 시험물질을 첨가하지 않은 대조군 세포수를 100%로 하여 각 시험물질의 상대적인 생존율을 구하였다.

Cell cycle 분석

Cell cycle은 Kim 등[25]의 방법에 따라 분석하였다. 시험 세포주(2×10⁶ cells/well)에 감귤 돌연변이 추출물을 72시간 동안 처리한 후 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 70% 에탄올로 4℃에서 30분 동안 고정하였다. 고정된 세포는 1,200 rpm으로 12분 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 1% FBS가 포함된 PBS로 2-3회 세척하였다. 준비된 세포를 500 µg/ml의 PI로 염색한 후 10 µg/µl의 RNase가 포함된 PBS (1% FBS)에 넣어 37℃에서 30분 간 반응시키고 BD FACS calibur™ flow cytometer (BD biosciences, San Jose, CA, US)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

DNA fragmentation 분석

세포(2×10⁶ cells/well)에 감귤 돌연변이 추출물을 처리하여 72시간 동안 배양하고, 세포를 수집하여 genelute™ mammalian genomic DNA miniprep kit로 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 1.8% agarose gel에서 60-120분(50 V) 동안 전기영동하여 EtBr로 염색하고 UV transilluminator 하에서 DNA 단편화 현상을 관찰하였다.

Nitrite 생성량 측정

Nitrite 생성량은 Kim 등[25]의 방법에 기반하여 측정하였다. 감귤 돌연변이 추출물을 처리한 배양용기에서 100 µl의 배지를 취하여 동량의 griess reagent를 첨가하고 이를 10분간 실온에서 반응시켜 oxidation products인 NO₂⁻ 생성 정도를 540 nm 파장에서 측정하였으며, 이때 NO₂⁻ 농도에 대한 표준곡선은 NaNO₂를 사용하여 작성하였다.

Reverse transcription-polymerase chain (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석

감귤 돌연변이 추출물을 처리한 세포를 모은 다음 TRI reagent를 처리하여 total RNA를 분리하였으며, 분리된 RNA는 UV spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, GE healthcare, US)로 정량한 후 TOP script™ one-step RT PCR kit와 각각의 primer (Table 1), DEPC water를 넣고 유전자증폭기 (Genepro, Bioer Tech, Hangzhou, China)에서 증폭하였다. mRNA 발현 수준을 비교하기 위하여 각 PCR 산물을 EtBr이 첨가된 1.5% agarose gel에서 60-90분(50 V) 동안 전기영동하였으며, β-actin을 internal control로 사용하였다.

통계 처리

본 실험의 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 통계 처리는 student's t-test에 의해 p<0.05인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

감귤 돌연변이의 암세포종에 대한 증식 저해

다양한 인간 암세포종(HCT116, 인간대장암세포; A375, 인간흑색종세포; Hela, 인간자궁경부암세포; MCF-7, 인간유방암세포; A549, 인간폐암세포; HepG2, 인간간암세포) 및 정상 세포(16HBE140-, 인간정상폐세포; CHANG, 인간정상간세포)를 대상으로 감귤 돌연변이 추출물의 항암 활성을 스크리닝하였다. 세포 독성의 정도를 trypan blue exclusion assay를 통하여 농도별(0-400 µg/ml)로 탐색하였을 때 A375 세포를 제외한 모든 암종에서 농도 의존적인 증식 억제가 관찰되었으

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Neuronal NOS	Sense	5'-TTGGGGCCTGGGATTTCTGG-3'
	Antisense	5'-GTTGGCATGGGGGAGTGAGC-3'
Inducible NOS	Sense	5'-CCAGTGACACAGGATGACCTTCAG-3'
	Antisense	5'-TGCCATTGTTGGTGG AGTAACG-3'
Endothelial NOS	Sense	5'-CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT-3'
	Antisense	5'-GTCTCGGAGCCATACAGGATT-3'
X-chromosome-linked IAP	Sense	5'-ACACCATATACCCGAGGAAC-3'
	Antisense	5'-CTTGCACTGTCTTCTGAGC-3'
Chromosomal IAP-1	Sense	5'-AAGTTCCTACCCCTGTCCAATG-3'
	Antisense	5'-CAAGTAGATGAGGGTAACTGGC-3'
Chromosomal IAP-2	Sense	5'-CCTGTGGTTAAATCTGCCAATG-3'
	Antisense	5'-CAATTCGGCACCATAACTCTG-3'
Survivin	Sense	5'-GCATGGGTGCCCGACGTTG-3'
	Antisense	5'-GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA-3'
β-actin	Sense	5'-GGTCATCTTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGT-3'
	Antisense	5'-CCCAGGCACCAGGGCGTGAT-3'

며, 각각에 대한 EC₅₀ (50% effective concentration) 값이 387 (HCT116), 364 (MCF-7), 296 (Hela), 458 (A549), 670 µg/ml (HepG2)로 Hela 세포에서 가장 높은 감수성을 보였다(Fig. 1).

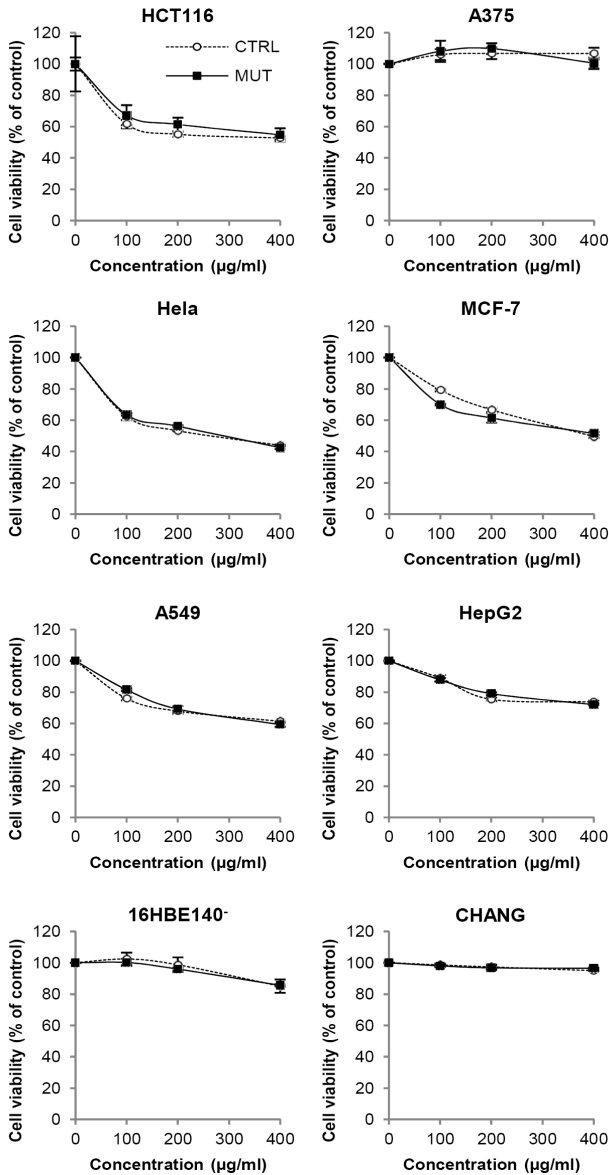


Fig. 1. Proliferation inhibition of human cancer cells (HCT116, human colon cancer; A375, human melanoma; Hela, human cervical cancer; MCF-7, human breast cancer; A549, human lung cancer; HepG2, human liver cancer) and normal cells (16HBE140, human normal bronchial epithelial cells; CHANG, human normal liver cell) by citrus mutant fruits. Cells (2×10^6) were incubated with citrus mutant fruits or *Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa-wase at 0-400 µg/ml at 72 hr. The viability of cells was determined by the trypan blue exclusion assay. The data are expressed as the percent of cell viability (% of DMSO control). Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

또한 감귤 돌연변이의 저해 활성이 방사선을 조사하지 않은 가지에서 착과된 감귤 추출물(방사선 무처리군, CTRL)의 EC₅₀ 값(HCT116: 347, Hela: 294, MCF-7: 372, A549: 475, HepG2: 707 µg/ml)과 비교했을 때 유사한 수준으로 조절되었으며, 정상세포주(16HBE140-와 CHANG)에 대한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

이러한 현상은 유방암세포 MCF-7과 유방세포 MCF-12F에 lime 및 lemon 추출물을 처리하였을 때와[1, 3, 22] SH-SY5Y (신경아세포종), MDA-MB-231(유방암세포), PC3(전립선암세포), PC12(쾌장암세포)에 bergamot 추출물을 첨가하였을 때[12, 39] 정상세포에는 무해하지만 처리 농도에 비례하여 암세포 특이적인 세포독성을 유발한다는 결과들과 유사한 것으로 보인다. Lee 등[31]에 따르면 bitter orange 추출물의 naringin, hesperidin 등의 성분은 인간 위암종에 대한 사멸 작용을 하고, Chidambara 등[11]은 blood orange에 함유된 생리활성 물질이 대장암종 SW480, HT-29에 대해 암세포의 성장을 저해한다고 보고하고 있다. 부가적으로 감귤류의 주요 효능 성분인 tangeretin, hesperetin, limonoid 등의 유도체가 여타 암종을 억제하는 것으로 밝혀지고 있어[2, 10, 13, 23], 본 연구에서도 감귤 돌연변이 추출물이 함유하고 있는 다양한 phytochemical 및 항산화 활성이 여러 암종의 증식 저해에 영향을 미친 것으로 추측된다.

감귤 돌연변이의 apoptosis 유도

암세포종 중 증식 저해능이 높았던 폐암(A549)과 간암(HepG2) 세포주를 선별하여, 감귤 돌연변이에 의해 유도된 사멸이 apoptosis 유발에 기인하는지 파악하기 위한 전략으로 sub-G1 발생 유무와 DNA 분절 형성 여부를 탐색하였다. 먼저 apoptosis가 일어난 집단을 정량적으로 측정한 결과 Fig. 2A에 제시된 바와 같이 sub-G1 발생이 감귤 돌연변이 처리에 따라 현저히 상승되어 A549와 HepG2 세포에서 각각 26.8%, 19.5%의 비율로 DMSO 처리군에 비하여 약 2.8-3.4배 가량 증가되었으며, 방사선 무처리군과 비교하였을 때(A549: 28.9, HepG2: 19.4%) 역시 통계적 유의차를 보이지 않았다. 다음으로 sub-G1 fraction 증가에 따라 가장 일반적으로 동반되는 DNA fragmentation 형성을 조사하였을 때 Fig. 2B와 같이 암세포종 특이적인 DNA laddering을 확인할 수 있어, 결과적으로 감귤 돌연변이 추출물에 의해 유도된 증식 억제 작용이 apoptosis 유발에 기반하며 인간 암종에 대해 선택적인 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

이와 같이 감귤류의 항암효능은 폐암 세포 A549와 CL1-5에서 JNK 활성화에 따른 apoptosis를 유발하거나 A549, ECV304 세포에서 p53 활성화 및 Bax/Bcl-2 ratio 증가에 따른 사멸효과를 나타내고 Korean *Citrus aurantium* L.에서 분리동정된 flavonoid 성분이 intrinsic pathway 진행에 따른 apoptosis를 초래하여 A549 세포를 저해하는 등 다수 보고되어있다[8, 33,

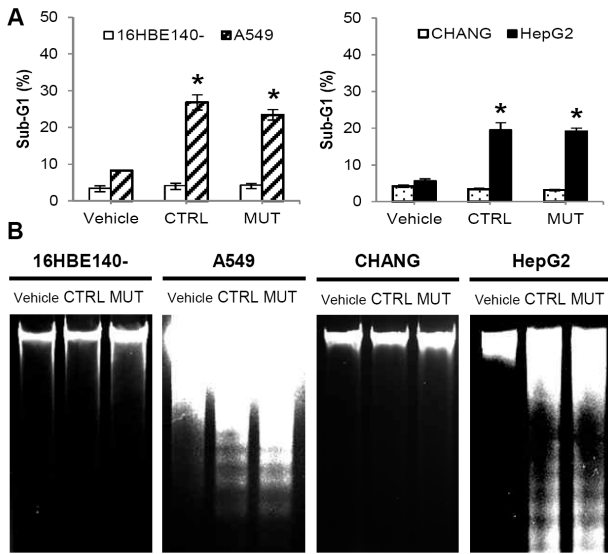


Fig. 2. The apoptosis of citrus mutant fruits extracts. A549 and HepG2 cells were treated with citrus fruits at 0-400 μ g/ml and harvested after 72 hr. After incubation, cells were collected, fixed by 70% ethanol and stained with PI and analyzed flow cytometry (A). Sub-G1 region indicates to the cells with hypodiploid DNA content and is characteristic of cells undergoing apoptosis which have lost DNA owing to nuclear fragmentation. (B) The DNA fragmentation was assayed by 1.8% agarose gel electrophoresis. Results are expressed as mean \pm SD from three separated experiments. *, $p < 0.05$ compared with vehicle.

36]. 이 뿐 아니라 Charoensinphon 등[7]이 tangeretin 및 5-methyltangeretin을 폐암 3종(A549, H460, H1299)에 투여하여 세포주기를 분석한 결과 세포주기 중 sub-G1 fraction의 분포가 농도 의존적으로 증가하였으며, Hung 등[17]이 합성 didymin을 A549와 H460에 처리하여 세포사멸 변화를 측정하였을 때 Fas 활성화에 따른 apoptosis를 유도한다고 발표하였다. 이와 더불어 본 연구결과는 간암 세포주에서 hesperidin과 naringenin의 투여가 각각 MAPK 및 mitochondria-mediated pathway를 통한 항암 효능을 강화한다는 기존 연구결과와 유사한 경향성을 갖는다[5, 45].

감귤 돌연변이의 nitrite 생성

NO^{*}는 암종에서 발생량에 따라 apoptosis를 항진시키는 작용을 하기 때문에 본 연구에서는 감귤 돌연변이에 의해 유도된 apoptosis의 새로운 표적을 제시하기 위해 NO^{*}와의 상관 관계를 검토하였다[15, 16]. Fig. 3B에 제시된 바와 같이 방사선 무처리군에서 nitrosative stress 유발에 의한 세포 손상이 관찰되어 선행 연구 결과를 뒷받침함과 동시에, 감귤 돌연변이에서도 이와 유사한 현상이 야기되었다. 보다 상세히 기술하자면 A549와 HepG2 세포에서 감귤 돌연변이 처리에 따

라 nitrite 발생이 유의적으로 증가하여 400 μ g/ml에서 DMSO 처리군과 비교하여 약 2.2배 증대되었다. Nitrite 발생의 분자적 근원 파악을 위해 추가적으로 3가지 NOS 동형 단백질에 대한 RT-PCR을 시행한 바 Fig. 3A와 같이 병리학적 상태에 주요한 역할을 수행하는 NOS의 발현이 효과적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중에서도 A549에서는 nNOS가, HepG2에서는 iNOS가 현격하게 증가하였다.

Chakraborty 등[6]의 연구에서 piper의 hydroxychavicol에 의해 발생된 NO^{*}는 만성 골수성 백혈병 세포 K562의 eNOS 발현을 증강시킴으로써 apoptosis를 유도하고 aloe에 포함된 emodin은 NO^{*} 조절에 의한 apoptosis 및 cell cycle arrest를 유발하였다[42]. 여타 연구결과에서도 이와 유사한 현상이 발표되었는데, 감귤류에 포함된 isoorientin은 HepG2에서 NO^{*} 생성 및 PI3K/Akt 조절에 의한 mitochondria 기능상실을 일으키고[44], goldenseal에서 추출한 berberine 성분은 nitrite 생성에 의한 apoptosis를 증강시킴과 동시에 방사선조사에 따

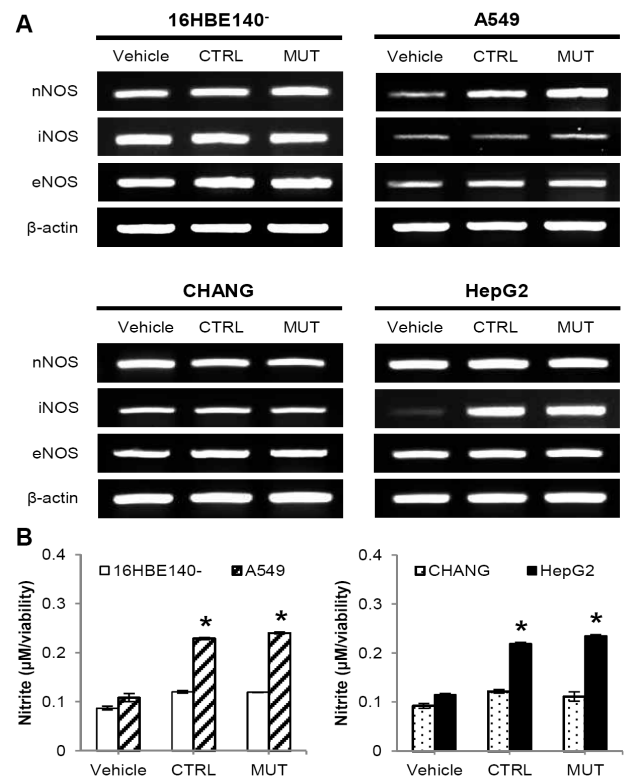


Fig. 3. Citrus mutant fruits induced accumulation of nitrite. Alterations in the expression of NOS isoform during citrus mutant fruits induced apoptosis (A). Actin was used as internal control. (B) Nitric oxide (NO^{*}) production was determined as nitrite in supernatants of human cancer cells for 72 hr in complete medium in the presence of 400 μ g/ml of citrus mutant fruits. Release of was measured using griess reagent. Each point is the mean \pm SD of three experiments. *, $p < 0.05$ compared with DMSO vehicle.

른 HepG2의 방사선 저항성을 해소시켰다[18]. 아울러 여러 식물 소재에 함유된 capsaicin과 resveratrol 등의 유효 성분이 흑색종, 대장암, 방광암에서 NO[•] pathway를 거치며 종양을 억제하는 것으로 알려져 있다[26, 29, 41]. 본 연구진의 선행 연구에서도 상사한 양상을 띠어 감귤 돌연변이 처리에 따른 apoptosis 촉진에 NOS 증가에 의한 nitrite 생성이 관여하는 것이라 유추된다[24, 25]. 하지만 식물 제재에 의해 NO[•]가 제한되어 암종이 사멸한다는 판이한 결과도 보고되기 때문에 감귤 돌연변이에 의해 유도된 apoptosis와 NO[•]의 상관관계에 대한 보다 구체적인 분석이 요구될 것으로 사료된다.

IAP family 발현에 미치는 감귤 돌연변이의 영향

자연사멸에 관여하는 여러 생화학적 표지인자 중 antagonist로 작용하는 IAP 단백질은 전사조절인자인 nuclear factor kappa B의 조절을 받아 최종적으로 caspase와 직간접적으로 결합함으로써 그들의 apoptotic 활성을 억제하는 것으로 보고되어있다[43]. 이와 같은 사실을 바탕으로 방사선 무처리군과 감귤 돌연변이 처리에 따른 IAP family의 신호전달 양상을 분석한 결과 A549와 HepG2 세포에서 공통적으로 survivin의 발현이 현격히 저해됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 한편 XIAP와 cIAP-2는 암세포종에 따라 발현 양상이 상이하게 조절되어 감귤 돌연변이 처리 시 HepG2 세포에서는 XIAP와 cIAP-2의 발현 감소가 수반된 반면 A549 세포의 경우에는 발현 변화를 확인할 수 없었다(Fig. 3). IAP 중 유일하게 survivin의 저해는 세포사멸뿐 아니라 세포주기 중 G2/M기의 이행을 저하시켜 암종의 성장을 억제하는 것으로 조사되어 앞선 발현 변화는 cell cycle과 연관되어 조사되어야 할 것으로 추측되며, 전반적 발현 양상을 분석하여 볼 때 감귤 돌연변이 처리에 따른 IAP family의 발현이 방사선 무처리군과 비교하여 현저하게 감소되는 현상이 관찰되어 감마선 조사에 의한 감귤 돌연변이의 유전체 변형이 이와 같은 세포 사멸 과정에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

기존 보고에 의하면 naringin은 survivin을 불활성화시킴으로써 유방암 MDA-MB-231, -468, BT-549의 성장을 저해하고 [32], bergamottin은 IAP family에 의해 연계되는 mitochondria-mediated apoptosis 경로를 차단하여 4종의 인간 암종 (U266: 다발성골수종, DU145: 전립선암세포, MDA-MB-231: 유방암세포, Hep3B: 간암세포)의 세포사멸을 유도하는 것으로 보고된 바 있다[30]. 이 외에도 본 연구 결과는 bitter orange의 과피 추출물이 XIAP와 Akt의 활성을 현저히 감소시켜 백혈병세포 U937의 악성화를 억제한다는 연구결과와 감귤류에 함유되어 있는 apigenin이 NF-κB 활성화와 XIAP 불활성화를 통해 GSK-3β/NF-κB 경로를 거치며 2종의 위암세포(BxPC-3, PANC-1)의 증식을 억제한다는 연구결과와도 부합된다[14, 19]. IAP family의 발현에 영향을 미치는 NF-κB 활성화는 lemon 등에 다량 함유되어 있는 citrus limonoid obacunone에서 가

장 많이 보고되어 있으며 전립선암 세포주에서 Akt 불활성화에 따른 증식 저해[35], 유방암 세포주에서 p38 MAPK 이행에 따른 세포사멸을[21], 위암 세포주에서 cox-2 억제에 따른 anti-inflammatory 작용을 일으키는 것으로 발표되어 있다[9].

결론적으로 상기의 연구결과를 종합하여 추론해볼 때 본 연구에서 평가된 감귤 돌연변이는 NO[•] 생성 및 IAP 발현 저해에 의해 인체 암세포의 apoptosis를 유발하는 것으로 확인되었으며, 추후 본 연구결과를 토대로 감귤 돌연변이의 암세포 사멸기전에 대한 상세한 기전규명과 향후 암 치료제로써 감귤 돌연변이를 활용하기 위한 동물실험 등의 평가를 수행해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2011-0006617)과 농림축산식품부 해양수산부 농촌진흥청 산립청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호: 110052-05-5-SB030)에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Adina, A. B., Goenadi, F. A., Handoko, F. F., Nawangsari, D. A., Hermawan, A., Jenie, R. I. and Meiyanto, E. 2014. Combination of ethanolic extract of *Citrus aurantifolia* peels with doxorubicin modulate cell cycle and increase apoptosis induction on MCF-7 cells. *Iran J. Pharm. Res.* **13**, 919-926.
- Alshatwi, A. A., Ramesh, E., Periasamy, V. S. and Subash-Babu, P. 2013. The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **27**, 581-592.
- Alshatwi, A. A., Shafi, G., Hasan, T. N., Al-Hazzani, A. A., Alsaif, M. A., Alfawaz, M. A., Lei, K. Y. and Munshi, A. 2011. Apoptosis-mediated inhibition of human breast cancer cell proliferation by lemon citrus extract. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **12**, 1555-1559.
- Ardecky, R. J., Welsh, K., Finlay, D., Lee, P. S., Lopez, M. G., Ganji, S. R., Ramanan, P., Mace, P. D., Riedl, S. J., Vuori, K., Reed, J. C. and Cosford, N. D. P. 2013. Design, synthesis and evaluation of inhibitor of apoptosis protein (IAP) antagonists that are highly selective for the BIR2 domain of XIAP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4253-4257.
- Arul, D. and Subramanian, P. 2013. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathol. Oncol. Res.* **19**, 763-770.
- Chakraborty, J. B., Mahato, S. K., Joshi, K., Shinde, V., Rakshit, S., Biswas, N., Choudhury Mukherjee, I., Mandal, L., Ganguly, D., Chowdhury, A. A., Chaudhuri, J., Paul, K., Pal, B. C., Vinayagam, J., Pal, C., Manna, A., Jaisankar, P.,

- Chaudhuri, U., Konar, A., Roy, S. and Bandyopadhyay, S. 2012. Hydroxychavicol, a Piper beetle leaf component, induces apoptosis of CML cells through mitochondrial reactive oxygen species-dependent JNK and endothelial nitric oxide synthase activation and overrides imatinib resistance. *Cancer Sci.* **103**, 88-99.
7. Charoensinphon, N., Qiu, P., Dong, P., Zheng, J., Ngauv, P., Cao, Y., Li, S., Ho, C. T. and Xiao, H. 2013. 5-demethyltangeretin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 2103-2111.
 8. Chen, Y. K., Wang, H. C., Ho, C. T., Chen, H. Y., Li S., Chan, H. L., Chung, T. W., Tan, K. T., Li, Y. R. and Lin, C. C. 2015. 5-Demethylnobiletin promotes the formation of polymerized tubulin, leads to G2/M phase arrest and induces autophagy via JNK activation in human lung cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 484-504.
 9. Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2011. Apoptosis mediated cytotoxicity of citrus obacunone in human pancreatic cancer cells. *Toxicol. In Vitro* **25**, 859-867.
 10. Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2011. Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1616-1625.
 11. Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2012. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. *Life Sci.* **91**, 429-439.
 12. Delle Monache, S., Sanità, P., Trapasso, E., Ursino, M. R., Dugo, P., Russo, M., Ferlazzo, N., Calapai, G., Angelucci, A. and Navarra, M. 2013. Mechanisms underlying the anti-tumoral effects of *Citrus Bergamia* juice. *PLoS One* **16**, e61484.
 13. Dong, Y., Cao, A., Shi, J., Yin, P., Wang, L., Ji, G., Xie, J. and Wu, D. 2014. Tangeretin, a citrus polymethoxy-flavonoid, induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways. *Oncol. Rep.* **31**, 1788-1794.
 14. Han, M. H., Lee, W. S., Lu, J. N., Kim, G., Jung, J. M., Ryu, C. H., Kim, G. Y., Hwang, H. J., Kwon, T. K. and Choi, Y. H. 2012. *Citrus aurantium* L. exhibits apoptotic effects on U937 human leukemia cells partly through inhibition of Akt. *Int. J. Oncol.* **40**, 2090-2096.
 15. Hirst, D. G. and Robson, T. 2007. Nitrosative stress in cancer therapy. *Front. Biosci.* **12**, 3406-3418.
 16. Hirst, D. G. and Robson, T. 2010. Nitrosative stress as a mediator of apoptosis : Implications for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 45-55.
 17. Hung, J. Y., Hsu, Y. L., Ko, Y. C., Tsai, Y. M., Yang, C. J., Huang, M. S. and Kuo, P. L. 2010. Didymmin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Lung Cancer* **68**, 366-374.
 18. Hur, J. M., Hyun, M. S., Lim, S. Y., Lee, W. Y. and Kim, D. 2009. The combination of berberine and irradiation enhances anti-cancer effects via activation of p38 MAPK pathway and ROS generation in human hepatoma cells. *J. Cell Biochem.* **107**, 955-964.
 19. Johnson, J. L. and de Mejia, E. G. 2013. Flavonoid apigenin modified gene expression associated with inflammation and cancer and induced apoptosis in human pancreatic cancer cells through inhibition of GSK-3 β /NF- κ B signaling cascade. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 2112-2127.
 20. Kim, I. J. and Oh, S. K. 2011. Current state of citrus mutation breeding (2010). *J. Asian Agri. Biotech.* **27**, 67-71.
 21. Kim, J., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2014. Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity *in vitro* by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Biochimie.* **105**, 36-44.
 22. Kim, J., Jayaprakasha, G. K., Uckoo, R. M. and Patil, B. S. 2012. Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 423-430.
 23. Kim, J., Jayaprakasha, G. K., Vikram, A. and Patil, B. S. 2012. Methyl nomilinate from citrus can modulate cell cycle regulators to induce cytotoxicity in human colon cancer (SW480) cells *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* **26**, 1216-1223.
 24. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Antiproliferation effects of *Sasa quelpaertensis* Nakai in human cancer cells. *J. Life Sci.* **24**, 903-909.
 25. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Immature citrus fruits extracts enhance the apoptosis inducing potential of cisplatin in human malignant melanoma A375 cells via regulation of nitric oxide and inhibitor of apoptosis family (IAP). *J. Life Sci.* **24**, 454-460.
 26. Kim, M. Y. 2012. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. *Mol. Med. Rep.* **5**, 585-591.
 27. Kim, M. Y. 2013. Free radical scavenging and ferrous ion chelating activities of citrus fruits derived from induced mutations with gamma irradiation. *J. Life Sci.* **10**, 401-403.
 28. Kim, M. Y., Kim, I. J., Lee, H. Y., Lee, D. S., Im, S. J., Kim, J. H., Byun, J. H., Kim, J. Y., Lee, Y. J., Jeong, S. R., Kim, J. H. and Moon, S. H. 2012. Characterization of the antioxidant properties of citrus mutants induced by gamma-rays. *J. Life Sci.* **9**, 1495-1500.
 29. Kim, M. Y., Trudel, L. J. and Wogan, G. N. 2009. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. *Anticancer Res.* **29**, 3733-3740.
 30. Kim, S. M., Lee, J. H., Sethi, G., Kim, C., Baek, S. H., Nam, D., Chung, W. S., Kim, S. H., Shim, B. S. and Ahn, K. S. 2014. Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells. *Cancer Lett.* **354**, 153-163.
 31. Lee, D. H., Park, K. I., Park, H. S., Kang, S. R., Nagappan, A., Kim, J. A., Kim, E. H., Lee, W. S., Hah, Y. S., Chung, H. J., An, S. J. and Kim, G. S. 2012. Flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. induce G2/M phase arrest and

- apoptosis in human gastric cancer AGS cells. *Evid Based Complement Alternat. Med.* 515901.
32. Li, H., Yang, B., Huang, J., Xiang, T., Yin, X., Wan, J., Luo, F., Zhang, L., Li, H. and Ren, G. 2013. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β -catenin signaling pathway. *Toxicol. Lett.* **220**, 219-228.
 33. Luo, G., Guan, X. and Zhou, L. 2008. Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 966-973.
 34. Meiyanto, E., Hermawan, A. and Anindyajati. 2012. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, 427-436.
 35. Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2015. Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death. *Toxicology* **329**, 88-97.
 36. Park, K. I., Park, H. S., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee do, H., Kang, S. R., Kim, J. A., Zhang, J., Kim, E. H., Lee, W. S., Shin, S. C., Hah, Y. S. and Kim, G. S. 2012. Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean *Citrus aurantium* L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chem.* **135**, 2728-2735.
 37. Passante, E., Wurstle, M. L., Hellwig, C. T., Leverkus, M. and Rehm, M. 2013. Systems analysis of apoptosis protein expression allows the case-specific prediction of cell death responsiveness of melanoma cells. *Cell Death Differ.* **20**, 1521-1531.
 38. Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R. and Iranshahi, M. 2015. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sci.* **124**, 64-74.
 39. Russo, R., Ciociaro, A., Berliocchi, L., Cassiano, M. G., Rombolà, L., Ragusa, S., Bagetta, G., Blandini, F. and Corasaniti, M. T. 2013. Implication of limonene and linalyl acetate in cytotoxicity induced by bergamot essential oil in human neuroblastoma cells. *Fitoterapia* **89**, 48-57.
 40. Saleem, M., Qadir, M. I., Perveen, N., Ahmad, B., Saleem, U., Irshad, T. and Ahmad, B. 2013. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem. Biol. Drug* **82**, 243-251.
 41. Stocco, B., Toledo, K., Salvado, r M., Paulo, M., Koyama, N. and Torqueti Tolo, M. R. 2012. Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas.* **72**, 72-78.
 42. Tabolacci, C., Oliverio, S., Lentini, A., Rossi, S., Galbiati, A., Montesano, C., Mattioli, P., Provenzano, B., Facchiano, F. and Beninati, S. 2011. Aloe-emodin as antiproliferative and differentiating agent on human U937 monoclastic leukemia cells. *Life Sci.* **89**, 812-820.
 43. Varfolomeev, E., Izrael Tomasevic, A., Yu, K., Bustos, D., Goncharov, T., Belmont, L. D., Masselot, A., Bakalarski, C. E., Kirkpatrick, D. S. and Vucic, D. 2015. Ubiquitination profiling identifies sensitivity factors for IAP antagonist treatment. *Biochem. J.* **466**, 45-54.
 44. Yuan, L., Wang, J., Xiao, H., Xiao, C., Wang, Y. and Liu, X. 2012. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **265**, 83-92.
 45. Yumnam, S., Park, H. S., Kim, M. K., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, E. H., Cho, J. H., Shin, S. C. and Kim, G. S. 2014. Hesperidin induces paraptosis like cell death in hepatoblastoma, HepG2 cells: involvement of ERK1/2 MAPK. *PLoS One* **9**, e101321.

초록 : 감귤 돌연변이체의 인간 암세포 증식 억제와 자연사멸 증강효과

김지혜¹ · 김민영^{1,2*}

(¹제주대학교 생명자원과학대학 바이오소재전공 독성학 실험실, ²제주대학교 이열대농업생명과학연구소)

본 연구에 평가된 감귤 돌연변이는 기존 궁천조생 품종에서 유래된 방사선 돌연변이체로 선행 연구에서 다양한 생리활성 및 기능성 성분이 함유되어 있다는 것을 보고한 이래로, 감귤 돌연변이의 항암 제제로써 활용 가능성을 검증하였다. 여러 암종(HCT116, 인간대장암세포; A375, 인간흑색종세포; HeLa, 인간자궁경부암세포; MCF-7, 인간유방암세포; A549, 인간폐암세포; HepG2, 인간간암세포)을 대상으로 감귤 돌연변이의 항암 활성을 기존 궁천조생 품종(방사선 무처리군)과 비교 분석한 결과 그 효용 가치가 높게 나타났을 뿐 아니라 자연사멸 유도 메커니즘을 탐색하였을 때 감귤 돌연변이에 의해 야기된 apoptosis에 IAP family의 발현 저해와 NO[•] pathway 증강에 따라 세포 고사가 촉진됨을 확인할 수 있었다. 또한 감귤 돌연변이가 정상 세포에 대한 독성을 유발하지 않는 것으로 나타나, 암세포 선택성이 높은 chemopreventive 및 chemotherapeutic agent로 개발 가능할 것으로 예상되며 이를 위해 향후 보다 정밀한 자연사멸의 분자생물학적 기전 규명이 수반되어야 할 것으로 사료된다.