

DNA 사슬 종결형 항암제인 플루다라빈에 의해 유도된 세포독성에 대한 아로니아-홍삼 에탄올 혼합 추출물의 효과

김민섭 · 정유현 · 오흥근* · †박종군

원광대학교 생명과학부 기초자연과학연구소, *(주)휴벳

Effects of *Aronia melanocarpa* and Korean Red Ginseng Ethanol Extracts Combination on Cytotoxicity induced by Fludarabine, a DNA Chain Terminating Anti-Cancer Drug

Min Seob Kim, You Heon Chung, Hong Geun Oh* and †Jong Kun Park

Research Institute for Basic Science and Division of Biological Science, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

*Huvet Co., Ltd, Iksan 54630, Korea

Abstract

Fludarabine, a chain terminating anti-cancer drug, is a purine analogue that causes DNA strand breaks in normal cells. In this study, we determined if *A. melanocarpa* and Korean red ginseng extract mixture reduce cytotoxicity of fludarabine. Treatment of HaCaT cells with 10 μ M of fludarabine for 24 hours decreased cell viability and increased DNA strand breaks. Treatment of *A. melanocarpa* and Korean red ginseng extract mixture for 24 hours increased cell viability as compared with single extract treatment. The protective effect of these extracts on cell activity increased in a concentration-dependent manner. DNA strand breaks induced by fludarabine decreased as concentration of extract mixture increased. p-H2AX level, a marker of DNA strand breakage, decreased depending on the concentration of extract mixture. The effect of mixed extract of *A. melanocarpa* and Korean red ginseng on DNA damage is due to the anti-oxidative effect of *A. melanocarpa* and signal transmission through glucocorticoid receptor upon binding of saponin of Korean red ginseng.

Key words: fludarabine, DNA strand break, *Aronia melanocarpa*, Korean red ginseng

서 론

현재 환경오염에 대한 관심이 높아지면서 오염물에 의해 발생하는 유전자 상해에 대한 관심도 같이 증가되었다. 환경오염 물질은 다양한 종류의 자연발생물질 또는 인공물질과 합성화학물질 등이 있다. 환경오염 물질에 대한 노출은 세포 내에서 DNA나 단백질에 변성을 유도하여 기능 소실을 유도한다(Landvik 등 2010; Watanabe 등 2010; Tung 등 2012; Hemming 등 2015). 오염물질은 세포에 치명적인 영향을 미치기 때문에 상해반응에 대항하는 방어기작에 대한 연구 및 회복에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다(Tan &

Schimer 2017).

DNA 상에 발생하는 상해는 메틸화 및 에틸화 등의 염기서열 변이 외에도 단일 가닥 절단이나 이중 가닥 절단을 유발한다(Ciccio & Elledge 2010). DNA에 발생된 상해는 세포 주기를 정지시키고, DNA 회복 메커니즘의 조절을 통해 회복을 유도한다(Ventura 등 2017). 하지만 상해의 정도가 높을 경우, DNA의 회복 과정이 아닌 세포고사 메커니즘으로 유도된다(Pietenpol & Stewart 2002; Haupt 등 2003; Wang 2016).

합성화학물질은 농업, 가정용품, 의학 등 다양한 용도로 사용되고 있으며, 이들에 노출될 경우, 유전적 돌연변이 및 질병을 유도하기 때문에 정확한 활용법 및 적절한 사용량이 매

† Corresponding author: Jong Kun Park, Research Institute for Basic Science and Division of Biological Science, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea. Tel: +85-63-850-6200, Fax: +85-63-843-2781, E-mail: jkpark@wku.ac.kr

우 중요하다. 합성화학물질인 fludarabine은 1968년 생산된 물질로 강력한 알킬화제 물질이며, 림프성 백혈병에 효율적인 약물로서 사용되고 있다(Rai 등 2000). 또한 다른 약물들과 혼합하여 무통성 비 호킨즈 백혈병에 사용되고 있으며, 정맥 주사 또는 구강을 통해 투여한다. Fludarabine은 퓨린 유사체로 DNA 중합효소와 상호작용하여 DNA 합성을 저해한다(Carbone 등 2001). 또한 분열 중인 세포와 휴지기의 세포에도 영향을 미치며, 정상적인 세포 및 암세포에 독성을 나타내어 세포고사를 유도한다(Faria 등 2006). 또한 fludarabine은 세포 내에서 단사절단뿐만 아니라, 활성산소를 통해 스트레스를 유발한다(Rosato 등 2008).

아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 장미과에 속하는 다년생 낙엽관목이며, 열매는 약용이나 식용으로 사용된다(Chung HJ 2014). 아로니아에는 안토시아닌을 비롯한 polyphenol, flavonoid, resveratrol, quercetin, 다양한 미네랄류를 함유하고 있다(Jeong 등 2016). 아로니아의 안토시아닌은 배당체의 형태로 존재하고 있으며, 항산화 효과, 혈당조절, 심혈관질환 저해 효과, 면적조절기능 등 만성질환 예방효과가 있다(Oszmianski & Wojdylo 2005; Chung HJ 2014; Kardum 등 2014; Park HM 2014; Stanisavljević 등 2015; Park 등 2017). 생과는 떫은맛이 강해 생과를 직접 섭취하지 않고, 다양한 가공을 통해 섭취한다(Hwang & Thi 2014).

인삼(*Panax ginseng*)은 오가피나무과 인삼속에 속하는 다년생 초본류로서, 우리나라를 포함하여 동아시아권에서 오랫동안 사용되어 왔으며, 다양한 질병을 치료하는데 사용되어 왔다. 홍삼은 보통 6년근의 좋은 인삼을 말려서 사용하는 것으로, 말리는 과정을 통해 인삼의 유효성분이 농축되고 보관 및 복용이 용이하여 인삼의 가공법으로 이용되어 왔다(Choi 등 2010; Jiménez 등 2017). 또한 인삼은 면역증진, 항암, 항노화, 간 기능회복, 콜레스테롤 및 지방 감소 등의 효능이 보고되어 왔다(Kim 등 2005; Teng 등 2017; Yuan 등 2017). 그리고 인삼에 존재하는 사포닌류는 세포내에 p53의 수준을 높여 DNA 상해가 발생할 경우 빠른 회복에 도움을 준다(Ha 등 2010).

기존 연구(Ha 등 2010) 및 본 연구자의 미발표 실험결과를 기초로, fludarabine에 의해 유발된 활성산소가 아로니아 추출물에 의해 감소되고, 홍삼 사포닌이 fludarabine의 상해를 감소시킨다는 사실을 확인하였다. 본 연구에서는 인간 각질형성 세포주인 HaCaT 세포에 fludarabine을 처리하여 DNA 절단을 유도한 후, 아로니아와 홍삼 혼합 추출물이 세포독성과 DNA 절단의 회복에 보호효과를 보이는 것을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 아로니아와 홍삼 추출물은 건조시료의 20배량의 70% ethanol로 상온에서 24시간 동안 3회 반복 추출하여 여과지(Advantec, Tokyo, Japan)로 여과한 후, 여과액을 회전 진공증발기(Eyela, Tokyo, Japan)로 감압농축기(Buchi, Flawil, Switzerland)를 이용하여 농축한 후, -50°C 에서 동결건조기(Ilshinbiobase, Dongducheon, Korea)를 사용하여 건조시켰다. Fludarabine은 Selleckchem(Houston, Texas, USA)에서 구입하였고, p-H2AX 항체는 Cell signaling(Danvers, Colorado, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양 및 시료처리

인간 각질 세포주인 HaCaT세포는 10% fetal bovine serum과 2 mM L-glutamine이 함유되어 있는 RPMI-1640(Gibco Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA)을 사용하여 37°C , 5% 배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 fludarabine을 선처리 후 아로니아와 홍삼 각각 단일 추출물 또는 혼합 추출물을 처리하였다. 혼합 추출물의 제작은 각각의 추출물을 추출한 후, 두 개의 추출물을 혼합하여 제작하였다. 혼합 추출물의 배합은 아로니아와 홍삼을 6:4의 비율로 혼합하여 세포에 처리하였다. 각각 단일 추출물 또는 혼합 추출물을 다양한 혼합비율(1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1), 시간별(3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 h) 및 농도별(100, 200, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 진행하였다.

3. 세포 활성도 분석

세포 활성도 분석은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)(Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)를 이용하여 진행하였다. HaCaT세포를 96 well multiplate(SPL, Pocheon, Korea)에 각 well 당 1×10^5 개의 세포를 처리하고, 24시간 배양 후 FBS가 첨가된 새 배지와 시료로 채우고, 24시간 및 시간별로 배양하였다. Phosphate buffered saline으로 세척한 후 0.5 mg/mL의 MTT용액 100 μL 를 넣고, 4시간 동안 37°C 배양기에서 배양하고, 4시간 후 MTT용액을 완전히 제거하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) 200 μL 를 처리하여 formazan을 완전히 녹인 후 570 nm 파장에서 흡광도를 ELISA reader(Retisof Inc, Mississauga, Ontario, Canada)로 측정하여 수치를 정상 대조군에 대한 백분율로 계산 후 비교하였다.

4. DNA fragmentation

HaCaT세포에서 시료 처리 후 nuclei lysis buffer를 처리하고, 4°C 에서 30분 처리 후 PCI(Usb, Cleveland, Mississippi, USA)를 통해 상층액을 분리하였고, 상층액과 동량의 isopropanol

(Daejung, Siheung, Korea) 처리하여 12시간 이상 방치한 후 DNA를 분리를 진행하였고, 분리된 DNA를 absolute ethanol (Daejung, Siheung, Korea) 1 mL를 처리하여 순수한 DNA를 수거하여 D·W 50 μ L에 녹여 실험을 진행하였다. TAE buffer와 2% alkaline agarose gel을 사용하여 전기영동(Mupid CO, Tokyo, Japan)을 진행하고, transilluminator(UVP, Upland, California, USA)로 확인하였다. DNA 크기 측정은 이미지 프로그램을 이용하여 정상적인 DNA의 양을 비교하였다.

5. Western Blot

HaCaT세포에 각각 시료를 처리하고, 농도 및 시간별 처리하고, Lowery 방법에 따라 protein prep buffer(Intron, Seongnam, Korea)를 세포에 처리하고, 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다. SDS-PAGE(Bio-rad, USA)에서 분리시킨 후 Electrobolt system (BioRad, Hercules, California, USA)을 사용하여 250 mA로 1시간 동안 0.45 μ m polyvinylidene fluoride membrane(PVDF) (Milipore, Darmstadt, Germany)에 옮긴 후 TBS-T 완충용액으로 세척하고, 5% skim milk에 상온에서 30분 놓아두었다. p-H2AX(Abcam, Cambridge, UK)을 1:1,000의 비율로 희석한 시약을 처리하여 4°C에서 12시간 방치하였다. TBS-T 완충용액으로 15분간 3번 세척한 후 2차 rabbit 항체를 사용하여 4°C에서 2시간 반응시킨 후 TBS-T 완충용액으로 15분간 3번 세척하였다. 암실에서 developing solution(Elpis, Deajeon, Korea) A와 B를 1:1로 혼합한 액을 처리한 후, 곧 바로 Hyper film (Fuji, Tokyo, Japan)을 얹어 10초에서 5분 동안 노출한 후 현상하였다.

6 통계처리

모든 측정값은 평균값±표준편차(Mean±S.D.)로 표시하였으며, Sigmaplot을 이용하여 Student's *t*-test를 사용하였고, $p < 0.05$, $p < 0.01$ 일 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 세포 활성도에 대한 추출물들의 효과(Fig. 2)는 SPSS package (release 8.01)를 이용하여 two-way ANOVA 분석을 수행하였고, Duncan's multiple range test로 사후분석을 실시하였다. 평균값의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

홍삼과 아로니아는 단일 추출물로는 다양한 연구가 진행되어 많은 기전이 밝혀져 왔으나, 홍삼과 아로니아 혼합 추출물을 사용하여 DNA 절단의 회복을 분석한 연구는 거의 없는 실정이어서 본 연구에서는 DNA 상해요인으로 fludarabine을 24시간 처리한 후, 혼합 추출물을 처리하여 세포 활성도

와 DNA 가닥 절단 및 그 바이오마커인 H2AX 분석을 수행하였다.

1. 세포 활성도 측정

세포에 fludarabine 10 μ M을 24시간 처리한 후 다양한 배합의 아로니아와 홍삼 혼합 추출물 500 μ g/mL를 비교하였다. 아로니아나 홍삼의 비율이 높아질수록 단일 추출물의 세포 생존율과 유사한 결과를 보였으며, 본 연구에서 사용된 6:4의 아로니아와 홍삼 혼합 추출물 비율이 가장 높은 세포 활성도를 나타냈다. 이를 토대로 6:4의 아로니아와 홍삼 혼합 추출물의 농도 500 μ g/mL를 최적 농도로 하여 다른 실험에 이용하였다(Fig. 1).

세포에 fludarabine을 처리한 후 아로니아(A)와 홍삼(K) 추출물을 각각 농도별로 처리하였을 때 세포 생존율은 농도의 증가에 따라 활성도가 증가하였으며, 500 μ g/mL 이상 농도에서 소량 감소하는 것으로 관찰되었다. 또한 아로니아 6: 홍삼 4의 혼합 추출물(A+K)을 각각의 시료를 단일로 처리한 것보다 더 높은 활성도를 나타내었다. 혼합시료는 농도 의존적으로 세포생존율을 증가시켰으나, 500 μ g/mL의 농도에서 1,000 μ g/mL의 농도와 세포 활성도의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2).

Fludarabine을 처리하고, 홍삼과 아로니아 혼합 추출물을 500 μ g/mL로 처리하며, 시간의 경과에 따른 세포 활성도를 관

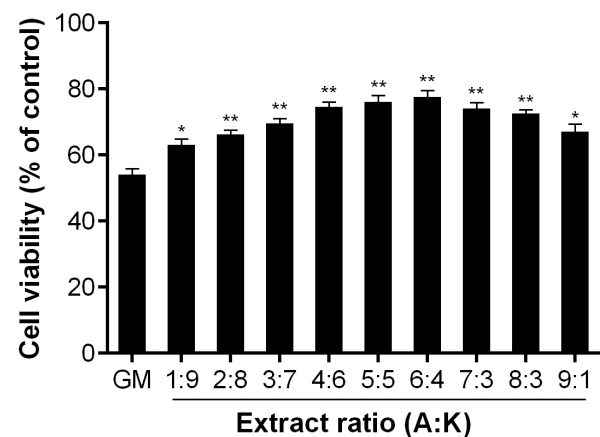


Fig 1. Effects of different extract ratio(A:K) on the cell viability in fludarabine(10 μ M)-exposed HaCaT cells. Cells were exposed to 10 μ M fludarabine for 24 h and then cultured for 24 h in medium without(GM) or with containing extracts (500 μ g/mL) with different ratio of *A. melanocarpa* extract to *P. ginseng* extract. Cell viability was measured as described in Materials and Methods. Data represent the mean±S.D. of at least triplicate experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ respectively, versus groups post-incubated with growth medium.

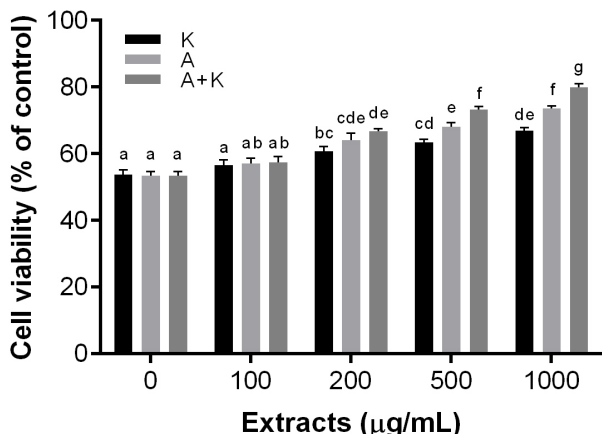


Fig. 2 Effects of single or combined treatment with *A. melanocarpha*(A) and Korean red ginseng(K) extract on the cell viability in fludarabine(10 µM)-exposed HaCaT cells. Cells were exposed to 10 µM fludarabine for 24 h and then cultured in medium for 24 h containing single *A. melanocarpha* or *P. ginseng* extract or extract combination(A+K). Cell viability was measured as described in Materials and Methods. Each value is the mean±S.D. of at least triplicate different experiments. Statistical analysis was performed using the two-way ANOVA. Means with different letters(a~g) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

찰하였다. 세포 활성도는 배양시간 경과에 따라 증가하였고, 21시간에 가장 높은 세포 활성도를 보였다. 이와 같은 결과로 보았을 때 홍삼과 아로니아는 세포에 주어진 상해를 빠르게 회복하는 메커니즘을 활성화시켜 주는 것으로 사료되며, 홍삼과 아로니아 혼합 추출물을 처리하였을 때 활성도가 더 증가한 것으로 보아, 서로 시너지 작용을 통하여 각각의 추출물보다 더 좋은 결과를 나타낸 것으로 사료된다(Fig. 3).

2. DNA fragmentation

세포에 10 µM의 fludarabine을 처리한 후 DNA를 추출하여 상해 정도를 비교하였다. Fludarabine만을 단일 처리한 군을 기준으로 홍삼 및 아로니아 혼합 추출물을 농도 의존적으로 처리하여 세포내 DNA사 절단 회복율을 비교하였다(Fig. 4). Fludarabine의 처리는 정상대조군(lane 1)보다 DNA 가닥 절단의 증가에 의한 짧은 크기의 DNA 단편들이 증가하였다(lane 2). Fludarabine을 24시간 처리한 후 혼합 추출물(A+K)의 처리는 농도 의존적으로 DNA 단편의 크기를 증가시켰다 (lanes 3~6). 고농도로 갈수록 정상적인 크기의 DNA의 비율이 증가하였다. 500 µg/mL의 혼합물 농도에서는 fludarabine 단일 처리군보다 정상적인 크기의 DNA비율이 약 2배 정도 증가하였다.

Fludarabine을 24시간 처리한 후 아로니아와 홍삼 혼합 추

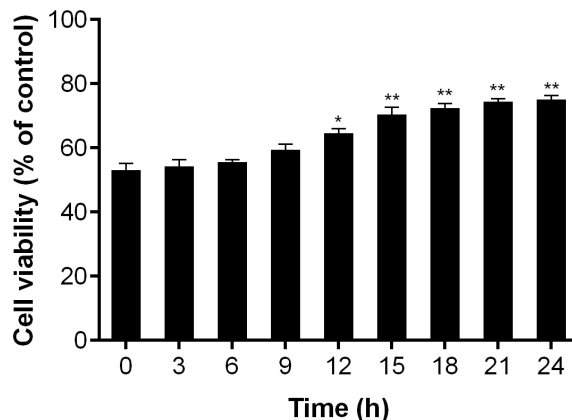


Fig. 3 Time-dependent effects of combined *A. melanocarpha* and Korean red ginseng extract mixture(A+K) on the viability in fludarabine(10 µM)-exposed HaCaT cells. Cells were exposed with fludarabine(10 µM) and then incubated with extract mixture (A+K) (500 µg/mL) for various time periods. Cell viability was measured as described in Materials and Methods. Data represent the mean±S.D. of at least triplicate experiments. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$, respectively, versus groups post-incubated with growth medium.

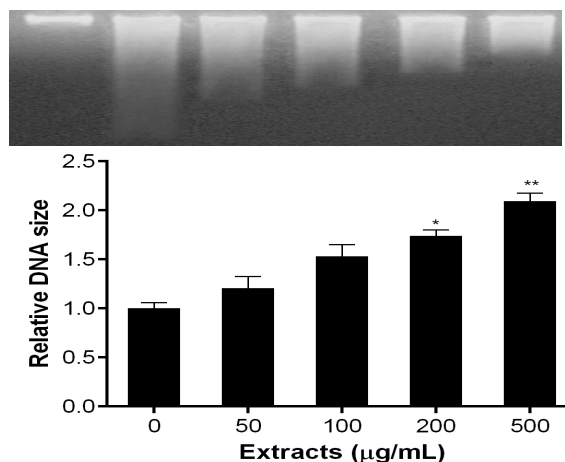


Fig. 4. Effects of combined *A. melanocarpha* and Korean red ginseng extract mixture(A+K) on DNA fragmentation in fludarabine(10 µM)-exposed HaCaT cells. Cells were exposed to fludarabine and then incubated in medium containing various concentrations of extract mixture. DNA fragmentation was analysed as described in Materials and Methods. Data represent the mean±S.D. of at least triplicate experiments. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ respectively, versus groups post-incubated with growth medium.

출물을 500 µg/mL를 처리하고, 시간 경과에 따른 DNA 가닥 절단의 회복을 Fig. 4의 전기영동 시간인 12시간의 2배인 24 시간 동안 전기영동하여 분석하였다(Fig. 5). Fludarabine 처리에 의해 감소된 DNA 길이는 혼합 추출물 처리시간이 경

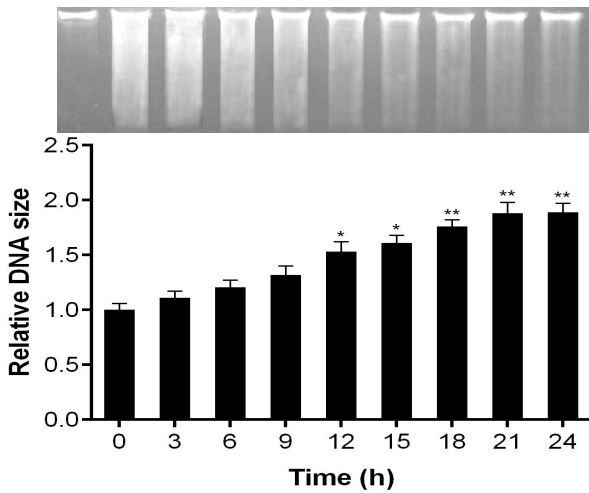


Fig. 5. Time-dependent effects of combined *A. melanocarpa* and Korean red ginseng extract mixture(A+K) on DNA fragmentation in fludarabine(10 μ M)-exposed HaCaT cells. Cells were exposed to fludarabine and then incubated with extract mixture(500 μ g/mL) for various time periods. DNA fragmentation was analysed as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm S.D. of at least triplicate experiments. * p <0.05 and ** p <0.01, respectively, versus groups post-incubated with growth medium.

과함에 따라 지속적으로 증가하며, 21~24 시간에서 최대치를 나타내었다.

3. Western blot

H2AX 단백질은 DNA상에서 상해가 발생되면 증가하는 단백질로서 DNA 절단인지 단백질로서 활용되고 있다. 따라서 p-H2AX의 농도가 증가한 것은 DNA 내에 절단이 많이 발생되었다는 것을 의미하며, 농도가 감소하는 것은 회복이 진행되어 안정된 상태가 된 것을 의미한다. 세포에 10 μ M fludarabine을 24시간 할 경우, 정상대조군에 비해 6배 정도의 p-H2AX의 수준이 증가되었다(Fig. 6, lane 2). 홍삼 및 아로니아 혼합 추출물(A+K)을 500 μ g/mL 24시간 처리하였을 때 농도 증가에 따라 p-H2AX의 수준이 감소하였다(lane 6).

Fludarabine(10 μ M) 24시간 처리에 의해 증가된 p-H2AX 수준이 홍삼과 아로니아 혼합 추출물(A+K, 500 μ g/mL)의 처리 시간 경과에 따라 어떻게 변화하는지를 분석하였다(Fig. 7). Fludarabine 처리에 의해 정상대조군(lane 1)보다 약 6배 증가한 p-H2AX의 수준(lane 2)은 혼합 추출물 후처리 시간 경과에 따라 감소하여(lanes 3-9), 24시간의 경우, 약 50% 정도로 감소하였다(lane 10).

이러한 결과를 통해 홍삼과 아로니아의 혼합 추출물이 fludarabine에 의해 발생된 DNA사 절단에 대한 회복 능력이 있

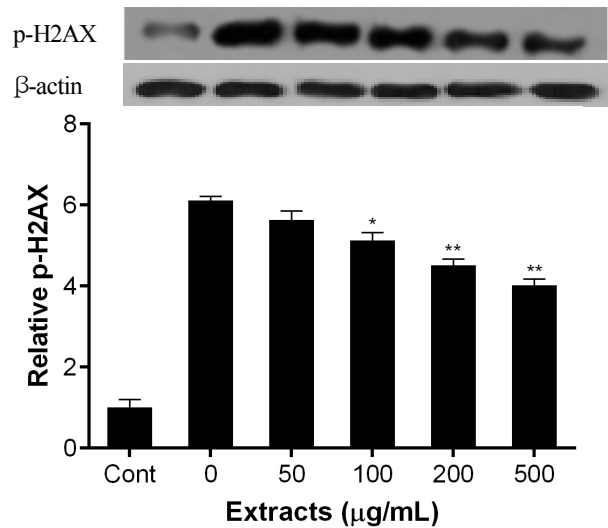


Fig. 6. Effects of combined *A. melanocarpa* and Korean red ginseng extract mixture(A+K) on p-H2AX in fludarabine(10 μ M)-exposed HaCaT cells. Cells were treated with fludarabine and then incubated with various concentrations of extract mixture. Western blot was measured as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm S.D. of at least triplicate experiments. * p <0.05 and ** p <0.01, respectively, versus groups post-incubated with growth medium.

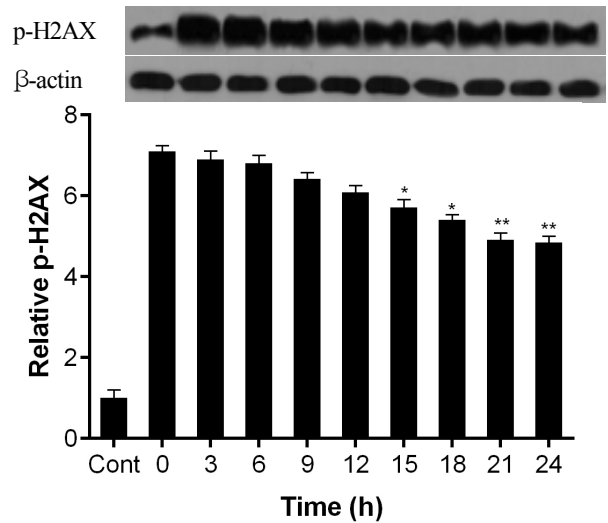


Fig. 7. Time-dependent effects of combined *A. melanocarpa* and Korean red ginseng extract mixture(A+K) on p-H2AX in fludarabine(10 μ M)-exposed HaCaT cells. Cells were exposed to fludarabine and then incubated with extract mixture (500 μ g/mL) for various time periods. Western blot was measured as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm S.D. of at least triplicate experiments. * p < 0.05 and ** p <0.01, respectively, versus groups post-incubated with growth medium.

는 것으로 보인다. DNA사 절단의 빠른 회복을 통해 세포가 세포고사의 진행을 막아 세포의 생존율을 높이는 것으로 관찰되었다. Fludarabine과 같은 환경독성물질에 대해 발생하는 세포내 상해반응에 대해 아로니아와 홍삼 혼합 추출물의 처리는 세포에 좋은 보호 효과를 줄 것으로 사료된다.

요약 및 결론

현재 환경독성 물질에 대한 관심과 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 합성화학물이 아닌 자연에 존재하는 천연물을 이용한 식품 소재들이 많이 개발되고 있다(Efeyan 등 2015; Shin & Shon 2015). 이러한 연구들을 통해서 많은 회사에서 천연물을 활용한 제품들이 출시되고 있으며, 대중의 관심으로 식품시장의 규모가 지속적인 성장을 하고 있다. 아로니아에 함유되어 있는 성분들은 매우 인체에 유익한 기능을 하는 것으로 알려져 있지만, 아로니아 과실의 맛이 떫어 과실 자체로 섭취하기보다는 제품을 통하여 섭취가 이루어진다(Olas 등 2008; Hwang & Thi 2014).

환경오염물질은 세포내 손상 및 세포내 물질을 변화 및 기능 소실을 유도한다(Landvik 등 2010; Tung 등 2012; Hemming 등 2015). 오염물질의 분자적 기능 외에 세포내에서 상해를 유발하면서 활성산소를 유발시키는데 세포내에서 상해가 강할수록 활성산소의 발생량은 많아진다(Fujisawa 등 2004). 시료로 사용된 홍삼과 아로니아는 각각의 효능을 가지고 있다. 아로니아는 flavonoid, resveratrol, polyphenol과 같이 항산화 효능이 뛰어난 성분을 함유하고 있다(Jeong 등 2016). 오염물질로 인해 DNA상에 발생된 상해로 인해 증가된 활성산소는 아로니아에 함유되어 있는 항산화 성분들에 의해 보호받게 된다(Jeong 등 2016). 홍삼은 사포닌을 함유하고 있으며, 사포닌은 다양한 효능에 대해 밝혀지고 있다(Teng 등 2017; Yuan 등 2017). 사포닌은 p53과 같은 DNA 상해반응에 반응하는 단백질들을 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Zhang 등 2015). 그렇기 때문에 DNA 상해가 세포내에서 유도되게 되면 홍삼을 처리한 군이 그렇지 않은 군보다 더 빠른 회복능력을 가지게 된다(Ha 등 2010; Zhang 등 2015). 아로니아와 홍삼의 서로 다른 세포내 기작을 이용하여 DNA 발생되는 염기 또는 가닥에 대한 상해와 부수적으로 발생되는 활성산소에 대해 각각의 시료를 처리하였을 때보다 더 좋은 결과를 얻은 것으로 사료된다(Zhang 등 2015; Jeong 등 2016). 이와 같이 서로 다른 메커니즘을 가지고 있는 천연물 또는 물질을 사용하여 서로 상호보완적인 기능에 대해 밝히는 것은 식품의 조합을 구상하는데 있어 도움이 될 것으로 사료된다.

본 연구에서는 아로니아의 효능을 보완하기 위하여 홍삼

을 이용하여 아로니아의 효능을 더욱 증대시키고자 하였다. 아로니아와 홍삼은 각각 단일로서 다양한 효능을 가지고 있는 것에 대한 많은 연구가 진행되었다(Stanisavljevic 등 2015; Zhang 등 2015; Jeong 등 2016; Park 등 2017). 아로니아와 홍삼을 단일 추출물로서가 아닌 두 개의 시료 혼합을 통해 단일 추출물처리보다 더 좋은 시너지 효과를 위해 두 개의 시료를 혼합하여 실험을 진행하였다. 홍삼에 대한 연구는 활발하나, 상대적으로 아로니아에 대한 연구가 아직 부족한 실정이며, 아로니아 복합추출물이나 홍삼의 복합추출물 외에도 아로니아에 함유하고 있는 flavonoid, resveratrol과 같은 구성물질에 대한 세포주의 반응 메커니즘에 대한 후속 연구가 필요하다.

본 연구에서는 아로니아와 홍삼의 혼합 추출물이 fludarabine의 세포독성을 감소시키는 것을 규명하고자 하였다. HaCaT 세포에 fludarabine 10 μ M을 24시간 처리하면 세포활성이 감소하고, DNA 가닥 절단이 증가하였다. 아로니아와 홍삼의 혼합 추출물을 24시간 처리하면 각각의 단일 처리보다 fludarabine에 의해 감소된 세포 활성을 더욱 증가시켰다. 이러한 혼합 추출물의 세포 활성 보호효과는 추출물의 농도에 의존적으로 증가하였다. 그리고 fludarabine에 의해 발생된 DNA 가닥 절단은 혼합 추출물의 농도가 증가할수록 감소하였다. 또한 DNA 가닥 절단의 표지 인자인 p-H2AX의 양이 혼합 추출물의 농도 의존적으로 감소하였다. DNA 상해에 대한 아로니아와 홍삼 혼합 추출물의 효과는 아로니아의 항산화 효과와 홍삼의 glucocorticoid 수용체를 통한 신호전달의 상승효과에 기인한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업”으로 수행된 연구결과입니다.

References

- Carbone GM, Catapano CV, Fernandes DJ. 2001. Imbalanced DNA synthesis induced by cytosine arabinoside and fludarabine in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 62:101-110
- Choi JE, Nam KY, Xiangguo L, Kim BY, Cho HS, Hwang KB. 2010. Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root parts of ginsengs with processing method. *Korean J Crop Sci* 18:118-125
- Chung HJ. 2014. Comparison of total polyphenol, total flavonoid, and biological activities of black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *J Korean Soc Sci Nutr* 43:1349-1356

- Ciccia A, Elledge SJ. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40:179-204
- Efeyan A, William C. Comb, David M. Sabatinl. 2015. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517:302-310
- Faria JR, Yamamoto M, Faria RM, Kerbauy J, Oliveira JS. 2006. Fludarabine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia - The role of P53, Bcl-2, Bax, Mcl-1, and Bag-1 proteins. *Braz J Med Biol Res* 39:327-333
- Fujisawa S, Asumi T, Ishihara M, Kadoma Y. 2004. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer Res* 24:563-570
- Ha SE, Shin DH, Kim HD, Shim SM, Kim HS, Kim BH, Lee JS, Park JK. 2010. Effect of ginsenoside Rg2 on the ultraviolet B-induced DNA damage responses in HaCaT cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382:89-101
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116:4077-4085
- Hemming JM, Hughes BR, Rennie AR, Tomas S, Campbell RA, Hughes AV, Arnold T, Botchway SW, Thompson KC. 2015. Environmental pollutant ozone causes damage to lung surfactant protein B (SP-B). *Biochemistry* 54:5185-5197
- Hwang ES, Thi ND. 2014. Antioxidant cotents and antioxidant activities of hot-water extracts of aronia(*Aronia melanocarpa*) with different drying methods. *Korean J Food Sci Tech* 46:303-308
- Jeong YJ, Lee AR, Park JH, Kim YH, Kwon YS, Hong YE, Han NS, Eom HJ. 2016. Nutritional compositions and physicochemical properties of two domestic aronia(*Aronia melanocarpa*) varieties. *Korean J Food Nutr* 29:283-289
- Jiménez Pérez ZE, Mathiyalagan R, Markus J, Kim YJ, Kang HM, Abbai R, Seo KH, Wang D, Soshnikova V, Yang DC. 2017. Ginseng-berry-mediated gold and silver nanoparticle synthesis and evaluation of their *in vitro* antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity effects on human dermal fibroblast and murine melanoma skin cell lines. *Int J Nanomedicine* 12:709-723
- Kardum N, Petrović-Oggiano G, Takic M, Glibetić N, Zec M, Debeljak-Martacic J, Konić-Ristić A. 2014. Effects of glucomannan-enriched, aronia juice-based supplement on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in subjects with abdominal obesity. *Scientific World Journal* 2014:869250
- Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim IS. 2005. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. *J Pharmacol Sci* 97:124-131
- Landvik NE, Arlt VM, Nagy E, Solhaug A, Tekpli X, Schmeiser HH, Refsnes M, Phillips DH, Lagadic-Gossmann D, Holme JA. 2010. 3-Nitrobenzanthrone and 3-aminobenzanthrone induce DNA damage and cell signalling in Hepa1c1c7 cells. *Mutat Res* 684:11-23
- Olas B, Wachowicz B, Nowak P, Kedzierska M, Tomczak A, Stochmal A, Oleszek W, Jeziorski A, Piekarski J. 2008. Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* in blood platelets. *J Physiol Pharmacol* 59:823-835
- Oszmiański J, Wojdylo A. 2005. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* 221: 809-813
- Park CH, Kim JH, Lee EB, Hur W, Kwon OJ, Park HJ, Yoon SK. 2017. *Aronia melanocarpa* extract ameliorates hepatic lipid metabolism through PPAR γ 2 downregulation. *PLoS One* 12:e0169685
- Park HM. 2014. Physiological activities of anthocyanin isolated from black chokeberry. MS Thesis, Catholic University of Daegu. Korea
- Pietenpol JA, Stewart ZA. 2002. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182:475-481
- Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA. 2000. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 343:1750-1757
- Rosato RR, Almenara JA, Maggio SC, Coe S, Atadja P, Dent P, Grant S. 2008. Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions. *Mol Cancer Ther* 7: 3285-3297
- Shin HS, Shon DH. 2015. Evaluation of antiallergic activities of natural and food materials. *Food Sci Biotechnol* 48:50-55
- Stanisavljević N, Samardžić J, Janković T, Šavikin K, Mojsin M, Topalović V, Stevanović M. 2015. Antioxidant and anti-proliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chem* 175:516-522
- Tan L, Schirmer K. 2017. Cell culture-based biosensing techniques for detecting toxicity in water. *Curr Opin Biotechnol* 45:59-68
- Teng S, Wang Y, Li P, Liu J, Wei A, Wang H, Meng X, Pan

- D, Zhang X. 2017. Effects of R type and S type ginsenoside Rg3 on DNA methylation in human hepatocarcinoma cells. *Mol Med Rep* 15:2029-2038
- Tung EW, Philbrook NA, Macdonald KD, Winn LM. 2012. DNA double-strand breaks and DNA recombination in benzene metabolite-induced genotoxicity. *Toxicol Sci* 126: 569-577
- Ventura C, Núñez M, Gaido V, Pontillo C, Miret N, Randi A, Cocca C. 2017. Hexachlorobenzene alters cell cycle by regulating p27-cyclin E-CDK2 and c-Src-p27 protein complexes. *Toxicol Lett* 270:72-79
- Wang X, Yan M, Zhao L, Wu Q, Wu C, Chang X, Zhou Z. 2016. Low-dose methylmercury-induced apoptosis and mitochondrial DNA mutation in human embryonic neural progenitor cells. *Oxid Med Cell Longev* 2016:5137042
- Watanabe C, Egami T, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Kawanishi S, Murata M. 2010. DNA damage and estrogenic activity induced by the environmental pollutant 2-nitrotoluene and its metabolite. *Environ Health Prev Med* 15:319-326
- Yuan Z, Jiang H, Zhu X, Liu X, Li J. 2017. Ginsenoside Rg3 promotes cytotoxicity of paclitaxel through inhibiting NF- κ B signaling and regulating Bax/Bcl-2 expression on triple-negative breast cancer. *Biomed Pharmacother* 89:227-232
- Zhang J, Yang Y, Lei L, Tian M. 2015. *Rhizoma paridis* saponins induces cell cycle arrest and apoptosis in non-small cell lung carcinoma A549 cells. *Med Sci Monit* 21:2535-2541

Received 17 May, 2017

Revised 16 June, 2017

Accepted 22 June, 2017