

Antioxidative and Anticancer Activities of Ethanol Extract of *Millettia erythrocalyx*

Soojung Jin¹, You Na Oh¹, Yu Ri Son^{1,2}, Sun Mi Choi², Hyun Ju Kwon^{1,2,3} and Byung Woo Kim^{1,2,3*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University Graduate School, Busan 47340, Korea

³Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received November 8, 2017 / Revised December 19, 2017 / Accepted December 20, 2017

Millettia erythrocalyx, a species of plant in the Fabaceae family, is widely distributed in the tropical and subtropical regions of the world, such as the Indies, China, and Thailand. The antiviral activity of flavonoids from *M. erythrocalyx* has been reported; however, the antioxidative and anticancer activities of *M. erythrocalyx* remain unclear. In this study, we evaluated the antioxidative and anticancer effects of ethanol extract of *M. erythrocalyx* (EEME) and the molecular mechanism of its anticancer activity in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. EEME exhibited significant antioxidative effects, with a concentration at 50% inhibition (IC₅₀) value of 2.74 µg/ml, as measured by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay; moreover, it inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner in HepG2 cells. Cell cycle analyses showed that EEME induced HepG2 cell accumulation in the subG1 phase in a dose-dependent manner. EEME also induced apoptosis of HepG2 cells, with increases in apoptotic cells and apoptotic bodies, as detected by Annexin V and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, respectively. Treatment with EEME resulted in increased expression of First apoptosis signal (Fas), a death receptor, and Bcl-2-associated X protein (Bax), a pro-apoptotic protein, and the activation of caspase-3, 8, and 9, resulting in the cleavage of poly (Adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP). Collectively, these results suggest that EEME may exert an anticancer effect in HepG2 cells by inducing apoptosis via both the intrinsic and extrinsic pathways.

Key words : Anticancer, antioxidative, apoptosis, HepG2 cells, *Millettia erythrocalyx*

서 론

전세계적으로 주요한 사망 원인 중 하나인 암은 그 사망률이 계속 증가하고 있어 2012년 한해 동안 전세계에서 8백만명이 암으로 사망하였으며, 우리나라에서는 2014년 한해 동안 7만 6천여명이 암으로 사망하였다[28]. 또한 통계청 자료에 따르면 국내 암종별 사망률은 폐암이 전체 암사망자의 22.8%로 가장 높았으며, 간암(15.1%), 위암(11.6%), 대장암(11.0%) 순으로 나타났다. 최근 암 치료에 관한 활발한 연구와 치료 성과에 5년 암생존율이 점차 증가하고 있는 추세이나, 치료법의 획기적인 발전보다는 기존 치료법의 개선과 진단 및 치료분야의 작은 개선에서 나타난다[14]. 따라서 뛰어난 항암활성을 보유하고 있으며 부작용이 적은 천연물 유래 소재의 중요성이 지속적으로 대두되고 있으며, 암세포의 성장 억제, 암세포 사멸 유도 및 암세포 조직의 혈관 형성 억제 등의 다양한 분자적

기전에 관해 활발히 연구되고 있다[17, 22].

세포자멸사라고도 불리는 apoptosis는, 위해 요인들에 노출되어 손상된 세포를 제거하기 위하여 사용되는 과정으로, 살아있는 세포의 생존과 사멸의 균형을 조절하여 항상성을 유지할 수 있도록 한다[12, 13]. 이러한 apoptosis 과정에 문제가 발생하여 제대로 작동되지 않을 경우 세포가 지속적으로 성장하게 되어 암화가 유도되며, apoptosis가 촉진될 경우 퇴행성 질환이 야기될 수 있다[3]. 따라서 암세포의 치료 및 제거를 위한 방법 중 하나로 암세포의 apoptosis를 유도하는 활성을 보유한 소재의 발굴 및 기전 연구가 활발히 진행되고 있다[8, 20, 26]. 세포의 apoptosis가 일어나면 형태학적으로는 세포의 수축, DNA의 분절, 염색질 응축에 의한 apoptotic body (사멸체) 형성 등 변화가 나타나며, 생화학적으로는 사멸수용체 (death receptor)를 통하는 외인성 경로(extrinsic pathway)와 미토콘드리아를 통한 내인성 경로(intrinsic pathway)의 두 가지 경로를 통한 세포 사멸이 유도된다[9, 30]. 외인성 경로를 통한 apoptosis는 세포 표면의 사멸수용체인 Fas, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 등에 세포외부의 신호들이 결합하여 death inducing signaling complex (DISC)를 형성하고, 이후 다양한 신호전달 시스템을 통하여 개시 caspase인 caspase-8이 활성화 된다[7, 10]. 또한 내인성 경로를 통한 apoptosis는 세포 내 Bcl-2 fam-

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2900, Fax : +82-505-182-6951

E-mail : bwkim@deu.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.

ily 단백질인 pro-apoptotic 단백질과 anti-apoptotic 단백질이 조절인자로 알려져 있으며, 이들 단백질들의 발현 조절에 의해 미토콘드리아의 막전위가 변화되어 cytochrome c가 세포질로 방출되고, 이후 개시 caspase인 caspase-9가 활성화되어 유발된다[1, 18, 25]. 외인성 경로와 내인성 경로를 통해 활성화된 caspase-8과 caspase-9는 실행 caspase인 caspase-3, -6, -7을 활성화시키고, 이들 활성화된 실행 caspase는 손상된 DNA 재생에 관여하는 효소인 poly ADP-ribose polymerase (PARP)와 같은 기질 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도한다[15].

*Millettia erythrocalyx*는 콩과(Fabaceae)에 속하는 식물로 중국, 태국, 인도, 아프리카 등 열대·아열대 지역에 분포한다[27]. *M. erythrocalyx*의 생리활성에 관해서는 *M. erythrocalyx*의 잎에서 분리한 flavonoid의 Herpes simplex virus에 대한 항바이러스 활성에 관한 보고가 있다[19]. 그러나 *M. erythrocalyx*의 항산화능과 항암활성 등에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 *M. erythrocalyx*의 에탄올 추출물을 사용하여 항산화능을 측정하고, 인체간암세포주인 HepG2에 대한 항암활성과 그 분자적 기전에 관하여 분석하였다.

재료 및 방법

시료 준비

M. erythrocalyx 에탄올 추출물(Ethanol extracts of *Millettia erythrocalyx*, EEME)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재 허브센터에서 구입(분양번호; FBM123-086)하여 사용하였으며, ethanol 95.0% GR급을 사용하여 45°C에서 sonicator를 이용하여 15분씩 1일 10회, 총 3일 반복하여 추출하고 농축 후 동결건조시킨 시료로서 적정 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)에 용해하였으며 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정

EEME의 항산화능 보유 유무를 확인하기 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거법을 이용한 전자공여능을 측정하였다. EEME를 농도별(2.56-320 µg/ml)로 메탄올에 녹여 준비한 후 96-well plate에 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 40 µl와 각 시료 160 µl를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(IC₅₀)를 계산하였다. 양성 대조군으로는 대표적인 항산화제인 ascorbic acid를 사용하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. 억제능의 백분율 공식은 다음과 같다.

DPPH radical scavenging activity (%) = $\{1 - (A-B)/C\} \times 100$

A: sample absorbance 520 nm

B: color control absorbance 520 nm

C: control absorbance 520 nm

세포배양

본 연구에 사용한 암세포주인 인체 간암 세포 HepG2, 인체 대장암 세포 HT29, 인체 폐암 세포 A549는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)으로부터 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

암세포 생존율 측정

EEME가 암세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 수용성의 water soluble tetrazolium salt (WST) assay를 수행하였다. 먼저 암세포주인 HepG2, HT29, A549 세포를 $3-5 \times 10^4$ cell/well의 농도로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양한 다음, 추출물을 농도별로 처리하고 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 이때 대조군으로는 0.1% DMSO를 처리하였다. 48시간 배양 후 WST assay reagent (Daeillab, Korea)를 well당 500 µl 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복실험을 하여 그에 대한 평균값으로 나타내었으며, 본 실험 결과를 바탕으로 이후 적정 처리 농도를 결정하였다.

세포의 형태 변화 관찰

EEME 처리에 의한 HepG2 세포의 형태학적 분석을 위하여 6-well plate에 $1-2 \times 10^5$ cell을 각각 분주하고 24시간 뒤 EEME를 적정 농도로 처리 후 48시간 동안 배양하였다. 그 후 도립현미경(Axiovert 40C; Carl ZEISS, Germany)을 사용하여 관찰하였으며, Axio Vision program을 사용하여 촬영하였다.

세포주기변화 분석

EEME의 HepG2 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여, HepG2 세포에 EEME를 농도 별로 처리한 다음 CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 세포주기변화를 분석하였다. 먼저 6-well plate에 HT29 세포를 5×10^5 cell의 농도로 분주하여 부착시킨 후, EEME를 다양한 농도로 처리하였다. 48시간 배양 후 세포를 회수하고 PBS로 세척한 다음, ribonuclease A를 실온에서 10분간 처리하고 propidium iodide (PI) 용액을 첨가하여 4°C에서 10분간 염색하였다. 염색된 세포는 Flow cytometry (Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 분석하였다.

Annexin V 염색에 의한 apoptosis 관찰

EEME 처리에 따른 HepG2 세포의 apoptosis 유도를 관찰하기 위하여, HepG2 세포에 농도 별로 추출물을 처리한 다음 Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Ger-

many)를 사용하여 염색하였다. 먼저 6-well plate에 HepG2 세포를 5×10^5 cell의 농도로 분주하여 부착시킨 후, EEME를 다양한 농도로 처리하였다. 48시간 배양 후 세포를 회수하고 Muse™ Annexin V & Dead Cell Reagent 100 μ l를 첨가하여 실온에서 20분간 반응한 다음, Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, Germany)로 분석하였다.

DAPI 염색에 의한 핵의 형태변화 관찰

EEME를 처리한 HepG2 세포를 회수하여 cytospin (Thermo scientific, USA)을 사용하여 슬라이드 위에 부착시키고 4% formaldehyde 용액으로 상온에서 10분간 고정한 다음, PBS로 세척 후 0.5% triton X-100으로 상온에서 10분간 permeabilization 시켰다. PBS로 3회 세척한 다음 1 μ g/ml의 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, USA) 용액을 이용하여 염색하였다. 차광한 상태로 상온에서 20분간 염색한 다음, PBS로 세척 후 Anti-fade mounting 용액을 사용하여 mounting하고, 형광현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 핵의 형태변화를 관찰하고 Axio Vision Program을 이용하여 촬영하였다.

Apoptosis 관련 단백질 발현 분석

EEME의 항암 활성의 분자적 기전을 밝히기 위해 apoptosis에 관여하는 단백질 발현을 Western blot hybridization으로 분석하였다. 농도별로 EEME를 처리한 HepG2 세포를 회수하여 PBS로 세척한 후, lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF]를 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시킨 다음 sonication 한 후 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 추출한 단백질의 농도를 Bradford assay로 결정한 후 30 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 대상 단백질의 항체와 hybridization하였다. Membrane washing 후 Horse radish peroxidase (HRP)가 tagging된 이차항체로 한 시간 동안 반응시킨 후 Western blotting luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 적용시킨 다음 chemiluminescence detection system (FluoChem® FC2; AlphaInnotech, USA)을 사용하여 분석하였다. Fas, Fas-associated death domain (FADD), Bcl-2, Capase-3, -8, -9, 및 actin의 일차 항체와 HRP-conjugated anti-rabbit, anti-goat, anti-mouse 등이차항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였으며, PARP와 Bax의 일차항체는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하여 사용하였다.

통계분석

모든 결과는 mean \pm SD (Standard deviation)로 나타내었으며, 분석된 실험 데이터의 통계적 유의성은 대조군과 각 시

료처리군의 실험데이터로부터 Student's *t* test를 통하여 검증하였다.

결과 및 고찰

EEME의 항산화능 분석

활성산소종(Reactive oxygen species)은 생체 대사 과정 중에서 끊임없이 발생되며 높은 반응성 때문에 세포신호와 항상성에 중요한 역할을 한다[5]. 대부분의 활성산소종은 생체 내에 존재하는 항산화 방어체계에 의해 분해가 되어 없어지지만 방어시스템의 균형이 깨지는 경우, 제거되지 못한 활성산소가 생체 내에 축적되어 DNA 및 단백질 등을 파괴하여 암, 관절염, 노화 등 각종 질병의 주요 원인이 된다[6, 11]. 따라서 다양한 생리활성 특히 항암활성을 보유하는 후보 소재의 개발을 위하여 항산화능 보유 유무의 확인은 매우 중요하다[4]. 본 연구에서는 EEME의 항산화능을 확인하기 위하여 DPPH radical scavenging activity 측정을 수행하였다. 그 결과 Table 1에 제시한 바와 같이 EEME의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 억제능이 0.51 μ g/ml에서는 23.95%, 2.56 μ g/ml에서는 49.28% 그리고 12.8 μ g/ml에서는 95.10%까지 억제시키는 것을 확인하였다. 또한 억제능 50%일 때의 EEME의 농도(IC₅₀)는 2.74 μ g/ml으로 양성 대조군인 ascorbic acid의 IC₅₀인 1.32 μ g/ml 보다는 약간 높았으나, 추출물인 것을 감안할 때 EEME가 뛰어난 항산화 활성을 지니는 것을 알 수 있었다.

EEME 처리에 의한 암세포 사멸 효과 및 HepG2 세포형태 변화

EEME의 항암활성을 확인하기 위하여 먼저 다양한 암세포에 대한 EEME의 사멸효과를 관찰하였다. 인체 간암세포 HepG2, 대장암 세포 HT29, 폐암세포 A549에 EEME를 농도별로 처리한 다음, WST assay를 수행하였다. 그 결과 Fig. 1A에 제시한 바와 같이 EEME 농도가 증가할수록 암세포의 생존율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 그 중에서도 인체 간암 세포주인 HepG2에 대한 EEME의 사멸효과가 가장 높았다. EEME 처리에 따른 HepG2의 생존율은 농도의존적으로 감소하였으며, 최고 농도인 200 μ g/ml에서는 생존율이 42.73%까지

Table 1. DPPH radical scavenging activity by ethanol extract of *Milletia erythrocalyx*

	Concentration (μ g/ml)	Inhibition rate (%)	IC ₅₀ (μ g/ml)
EEME	0.51	23.95 \pm 0.63	2.74
	2.56	49.28 \pm 0.67	
	12.8	95.10 \pm 0.18	
Ascorbic acid	0.51	29.90 \pm 0.43	1.32
	2.56	97.11 \pm 0.38	
	12.8	97.39 \pm 0.19	

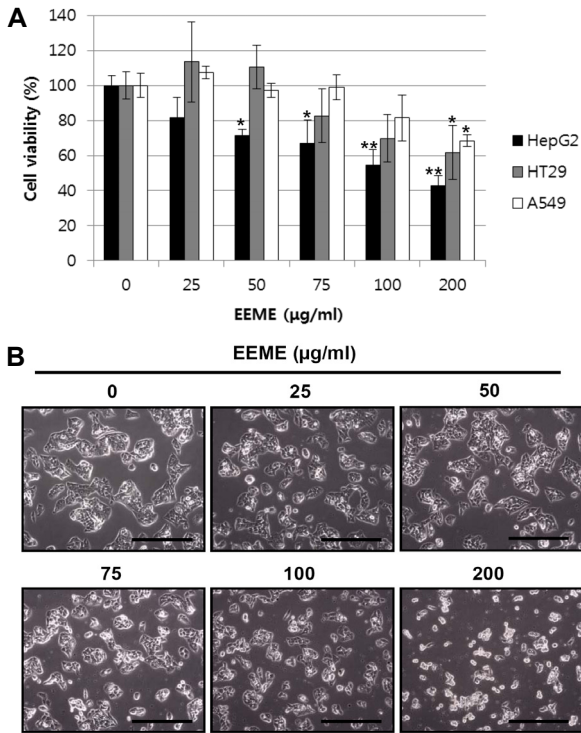


Fig. 1. Effects of EEME on cell growth in various cancer cell lines. (A) Human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, human colon carcinoma HT29 cells and human lung carcinoma A549 cells were treated with various concentrations of EEME for 48 hr. Cytotoxic effect of EEME was determined by WST assay. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared with DMSO treated cells. (B) Morphological changes by EEME in HepG2 cells. Cells were treated with indicated concentration of EEME for 48 hr, and then visualized by light microscopy. Scale bars, 100 μ m.

감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 EEME를 농도별로 HepG2 세포에 처리한 후 도립현미경을 사용하여 세포의 형태 변화를 관찰한 결과, Fig. 1B에서와 같이 50 μ g/ml의 EEME를 처리하

였을 때부터 점차적으로 세포 형태가 변하여, 75 μ g/ml의 EEME를 처리하였을 때부터 세포 형태가 불규칙적으로 변하며, 무리를 이루어 자라는 형태가 단일세포형태로 변하여 세포의 밀도가 점차 감소함을 확인하였다. 이러한 결과로부터 EEME 처리에 의해 암세포 특히 HepG2 세포의 사멸이 유도되며, 세포 형태가 변화되는 것을 확인하였으며, 따라서 이후 실험은 HepG2 세포를 사용하여 수행하였다.

EEME에 의한 HepG2 세포의 세포주기 변화 분석

암세포는 정상세포와는 달리 정상적인 세포주기 조절에서 벗어나 비정상적으로 무한 증식이 일어난다는 것이 보고되어 있으며, 항암제 연구를 위하여 암세포의 세포주기를 제어하거나, 암세포의 apoptosis를 유도하는 후보물질들의 연구가 활발히 진행되고 있다[2]. 따라서 본 연구에서는 EEME에 의한 HepG2세포의 증식억제 현상이 세포주기 조절에 의한 것인지 apoptosis 유도에 의한 것인지를 확인하기 위하여, HepG2 세포에 EEME를 농도별로 처리한 후 PI 염색을 하여 세포주기 변화를 Flow cytometry로 분석하였다. 세포주기 관찰의 원리는 PI 염색에 의하여 DNA content를 측정하는 것으로, apoptosis가 일어난 세포의 경우는 DNA 단편화에 의해 DNA content가 감소하게 되어 SubG1기의 세포비율이 증가하게 된다 [24]. 그 결과, Fig. 2에서 보여지는 바와 같이, EEME 농도의존적으로 SubG1기의 세포비율이 증가되는 것을 확인하였으며, 반면 G1, S, G2/M기의 세포비율은 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 이러한 EEME 처리에 따른 세포주기별 세포비율은 정량화하여 Table 2에 나타내었다. 대조군의 경우 7.82%였던 SubG1기 세포비율은 최고 농도인 100 μ g/ml의 EEME를 처리하였을 때 41.13%까지 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 이와 같은 결과는 EEME에 의해 HepG2 세포의 apoptosis가 유도된다는 것을 시사한다.

EEME에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유도

EEME에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유도를 확인하기 위하여 EEME를 처리한 세포를 Annexin V로 염색한 후 Cell

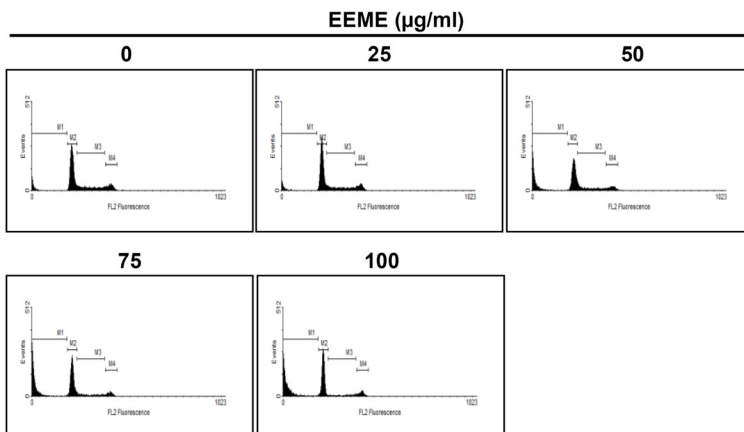


Fig. 2. Accumulation of SubG1 cells by EEME in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with indicated concentration of EEME for 48 hr. Cells were harvested, stained with propidium iodide for 30 min and analyzed by flow cytometry. DNA-fluorescence histogram is shown. M1, SubG1 phase; M2, G1 phase; M3, S phase; M4, G2/M phase.

Table 2. Cell cycle distribution of ethanol extract of *Millettia erythrocalyx*

EEME (µg/ml)	% of cells			
	SubG1 (M1)	G1 (M2)	S (M3)	G2/M (M4)
0	7.82	52.88	25.10	12.83
25	7.64	54.53	23.47	13.22
50	26.68	42.55	19.56	10.49
75	37.72	41.02	12.83	7.83
100	41.13	39.74	9.48	9.20

analyzer로 분석하였다. Apoptosis가 유발된 세포에서는 세포막의 점도 감소, 유동성 증가 및 막 인지질의 비대칭성 소실로 인하여 정상적으로는 지질 이중막의 내부에 존재하는 포스파티딜세린(PS)이 세포 표면으로 노출된다[21]. 세포표면으로 노출된 PS에 특이적으로 결합하는 물질인 Annexin V는 apoptotic 세포의 조기 표식자로 널리 사용되고 있다. 또한 7-aminoactinomycin D (7-AAD)는 죽어서 손상된 세포막을 투과 염색하므로 Annexin V 및 7-AAD 염색으로 세포의 apoptosis 유발여부를 확인할 수 있다[16]. 따라서 HepG2 세포에 EEME를 농도별로 처리한 다음 Muse Annexin V & Dead Cell Kit를 사용하여 Annexin V positive 세포의 빈도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 대조군에서의 Annexin V positive 세포는 5.10%였으나, EEME 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하여 최고 농도인 100 µg/ml에서는 54.95%까지 증가하였다. 특히 early apoptotic 세포의 수(Annexin V⁺/7-AAD⁻)는 EEME 농도의존적으로 서서히 증가하였으며, late apoptotic 세포(Annexin V⁺/7-AAD⁺)는 최고 농도인 100 µg/ml에서 29.35%까지 증가하였다.

세포(Annexin V⁺/7-AAD⁺)는 최고 농도인 100 µg/ml에서 급속하게 증가하였다. 반면 살아있는 세포는 EEME 농도의존적으로 감소하여 최고 농도인 100 µg/ml에서는 31.45%까지 감소하였다. 이러한 결과로부터 EEME에 의한 HepG2 세포의 사멸효과는 apoptosis 유도에 의한 것임을 확인하였다.

EEME에 의한 HepG2 세포의 세포핵 형태 변화 분석

세포에 apoptosis가 유도되면 세포막이 파괴되고 핵 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA의 단편화가 일어나게 되며, 이에 따라 염색질이 응축되어 apoptotic body를 형성하게 된다[30]. 앞서 EEME에 의해 HepG2 세포의 apoptosis가 유도되는 것을 확인하였으므로, 다음으로 세포핵 내의 변화를 관찰하기 위하여 HepG2 세포에 추출물을 농도별로 처리한 다음 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, Fig. 4에서와 같이 0.1% DMSO를 처리한 대조군의 경우와 비교하여 보았을 때 시료 처리 농도가 증가할수록 핵 내 염색질 농축이 일어나 apoptotic body가 증가하였음을 관찰하였다.

EEME의 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향

다음으로 EEME에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유발의 분자기전을 확인하기 위하여 EEME를 농도별로 처리한 다음, apoptosis 관련 단백질의 발현변화를 Western blot analysis로 관찰하였다. 그 결과, Fig. 5A에서와 같이 EEME의 처리에 의해 사멸수용체인 Fas의 발현이 증가되었으며, Fig. 5B에서는 EEME 처리에 의해 caspase-8이 활성화되고 최고 농도에서 cleaved caspase-8이 증가하는 것을 확인하였다. 현재까지 연

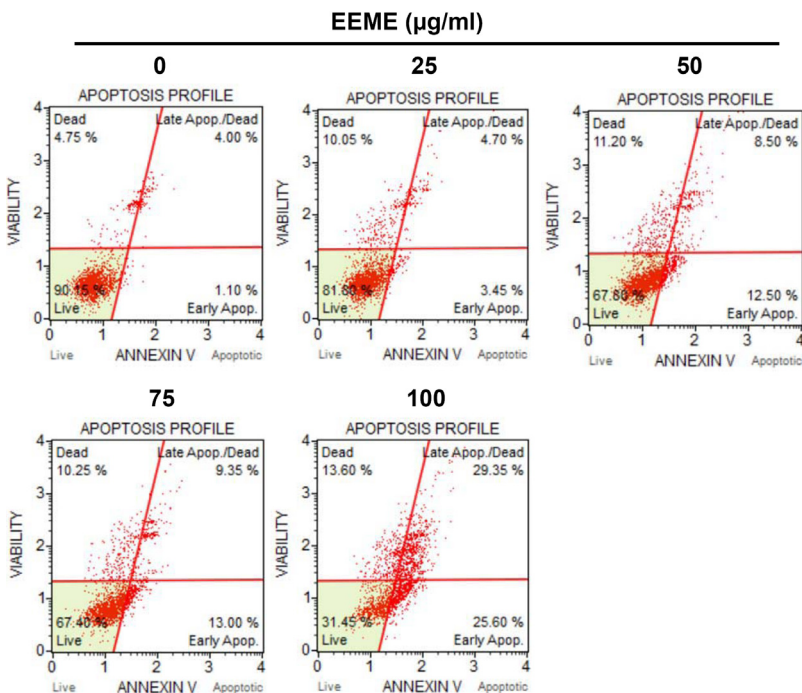


Fig. 3. Apoptosis induction by EEME in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with EEME for 48 hr. Cells were harvested, and then stained with MuseTM Annexin V & Dead Cell Kit for 20 min and analyzed by MuseTM Cell Analyzer. Dot plots represented four independent sections (UL: dead cells, UR: late apoptotic/dead cells, LL: live cells, LR: early apoptotic cells). The X axis shows the intensity of Annexin V fluorescence and the Y axis shows 7-AAD fluorescence.

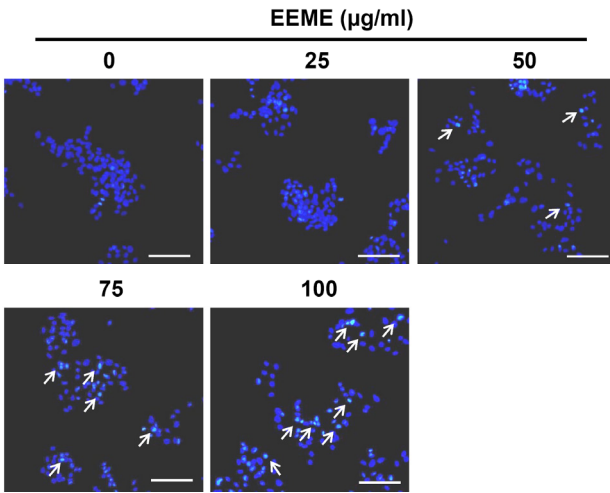


Fig. 4. Apoptotic morphological changes of HepG2 cells by EEME treatment. EEME-treated cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 and stained with DAPI for 20 min. Stained cells were observed by fluorescence microscopic analysis and imaged using Axio Vision Program. Arrows show the chromatin condensation of HepG2 cells by EEME. Scale bars, 100 µm.

구에 따르면, 사멸수용체인 Fas는 apoptosis의 외인성 경로에 관여하는 단백질로 알려져 있으며, 외부 신호가 Fas에 결합하면 Fas의 세포 내 domain에 FADD 단백질이 결합하여 신호가 전달되어 개시 caspase인 caspase-8이 활성화된다는 보고가 있다[29]. 따라서 이러한 실험 결과로부터 EEME에 의해 Fas의 발현이 유도되며, Fas를 통한 apoptosis의 외인성 경로를 통하여 caspase cascade의 개시 caspase인 caspase-8이 활성화된다는 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 5A에서 보여지듯이, EEME 농도의존적으로 Bcl-2 family 중 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현이 증가되었으며, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 감소하였다. Fig. 5B에서는 EEME 처리에 의해 caspase-9가 활성화되어 cleaved caspase-9가 증가하는 것을 확인하였

다. 내인성 경로를 통한 apoptosis의 경우, Bcl-2 family 단백질들 중 pro-apoptotic 단백질(Bax, Bak, Bid)과 anti-apoptotic 단백질(Bcl-2, Bcl-xL)의 세포 내 균형이 무너지면서, pro-apoptotic 단백질의 발현이 증가되어 미토콘드리아의 막전위 변화에 따른 cytochrome c의 방출이 유도되고, 세포질로 방출된 cytochrome c는 dATP 및 apoptotic protease activating factor 1 (APAF1)과 결합하여 apoptosome을 형성하여 개시 caspase인 caspase-9 활성화를 통해 apoptosis를 유도한다[31, 34]. 따라서 EEME 처리에 따른 Bcl-2 family의 발현 변화 및 caspase-9 활성화는 EEME에 의한 apoptosis가 내인성 경로를 통하여 유도되었음을 시사한다. 또한 Fig. 5B에서 알 수 있듯이, EEME 처리는 외인성 및 내인성 경로를 통해 일어나는 caspase cascade를 통해 실행 caspase인 caspase-3을 활성화시키고, 활성화된 cleaved caspase-3에 의해 최종 기질 중 하나인 PARP가 분해되었음을 확인할 수 있었다. 활성화된 caspase-3은 PARP, inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease (ICAD), gelsolin과 같은 여러 종류의 기질 단백질을 분해함으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져있다[23]. 따라서 이상의 결과로부터 EEME는 사멸 수용체를 통한 외인성 경로와 미토콘드리아를 통하는 내인성 경로의 두 가지 경로를 통해 HepG2 세포의 apoptosis를 유도하여 암세포의 증식을 억제시키는 것으로 판단된다.

우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 암은 사망원인 중 높은 순위를 차지하고 있으며, 환경문제, 서구화된 식습관, 고령화 등으로 인해 암환자의 발병률은 더욱 증가하고 있다. 암의 치료를 위해 많은 기전연구와 다양한 치료제의 개발이 이루어지고 있음에도 불구하고 암의 발병기전의 다양화 및 내성 등 부작용으로 인해 새로운 항암제의 개발은 여전히 필요하며, 그에 맞추어 새로운 천연물 의약품 연구가 활발히 진행되고 있다[32, 33]. 본 연구에서는 천연물 의약품 개발에 있어 후보 물질을 선별하기 위해, 자생식물 중 *M. erythralyx* 에탄올 추출물의 항산화 효과 및 간암 세포에 대한 항암기전을 분석

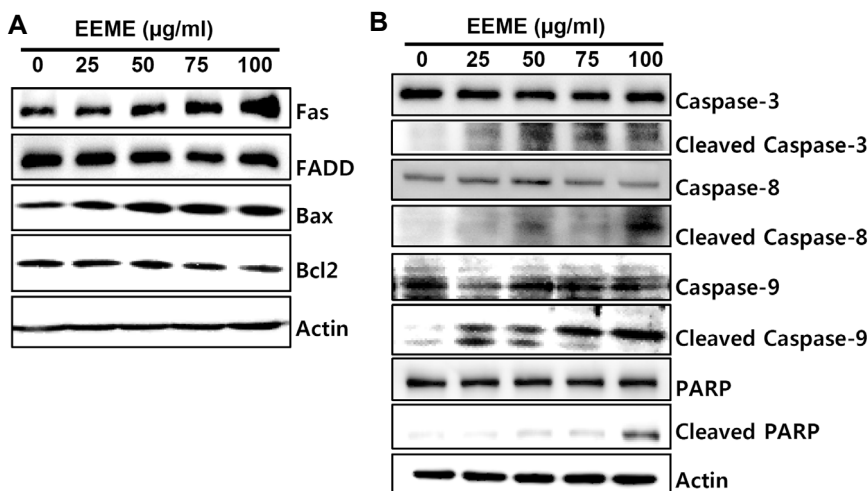


Fig. 5. Modulation of apoptosis-related protein expression in HepG2 cells by EEME. HepG2 cells were treated with various concentrations of EEME for 48 hr. The cells were lysed and proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by Western blot analysis using antibodies against (A) FAS, FADD, Bax and Bcl-2, (B) caspase-3, -8, -9, and PARP. Actin was used as an internal control.

하였으며, 그 결과 EEME가 뛰어난 항산화능을 가지며, 인체 간암 세포주 HepG2의 apoptosis 유도에 의한 항암 효과를 보이는 것을 확인하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 추후 EEME의 ROS 조절에 의한 항암활성에 대하여 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다. 아울러 본 연구결과는 *M. erythrocalyx*의 생리활성 연구를 위한 중요한 기초자료가 될 뿐 아니라, 새로운 천연물 유래 항암제의 후보 물질의 기전 연구 및 개발을 위한 중요한 자료로 사용될 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부·부산광역시 지원 지역혁신센터 사업(B0010792) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어 졌습니다.

References

- Adam, J. M. and Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-1337.
- Bhanot, A., Sharma, R. and Noolvi, M. N. 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *Int. J. Phytomedicine* **3**, 9-26.
- Carson, D. A. and Ribeiro, J. M. 1993. Apoptosis and disease. *Lancet* **341**, 1251-1254.
- Choi, I. P. 2013. Reactive oxygen species and cancer. *Hanyang Med. Rev.* **33**, 118-122.
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. and Lele, R. D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India* **52**, 794-804.
- Dickinson, B. C. and Chang, C. J. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504-511.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516.
- Fluda, S. 2015. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **31**, 84-88.
- Fluda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Galluzzi, L., Lopez-Soto, A., Kumar, S. and Kroemer, G. 2016. Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity* **44**, 221-231.
- Halliwell, B. H. and Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
- Han, S. I., Kim, Y. S. and Kim, T. H. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* **41**, 1-10.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Howlander, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Kosary, C. L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D. R., Chen, H. S., Feuer, E. J. and Cronin, K. A. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. J., Pals, S. T. and van Oers, M. H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415-1420.
- Landis-Piwowar, K. R. and Iyer, N. R. 2014. Cancer chemoprevention: current state of the art. *Cancer Growth Metastasis* **7**, 19-25.
- Li, P., Nijhawan, D. and Wang, X. 2004. Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* **116**, S57-59.
- Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Benchanak, K., Lipipun, V., Mathew, J. and Schinazi, R. F. 2005. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Nat. Prod. Res.* **19**, 177-182.
- Lowe, S. W. and Lin, A. W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485-495.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. and Green, D. R. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *J. Exp. Med.* **182**, 1545-1556.
- Neergheen, V. S., Bahorun, T., Taylor, E. W., Jen, L. S. and Aruoma, O. I. 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* **278**, 229-241.
- Porter, A. G. and Janicke, R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99-104.
- Riccardi, C. and Nicoletti, I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* **1**, 1458-1461.
- Riedl, S. J. and Shi, Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 897-907.
- Singh, S., Singh, P. P., Roberts, L. R. and Sanchez, W. 2014. Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 45-54.
- Sritularak, B. and Likhitwitayawuid, K. 2006. Flavonoids from the pods of *Millettia erythrocalyx*. *Phytochemistry* **67**, 812-817.
- Stewart, B. W. and Wild, C. P. 2014. World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer (IARC), Geneva, World Health Organization.
- Strasser, A. and Newton, K. 1999. FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 533-537.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. 2008. Apoptosis:

- controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231-241.
31. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. 2000. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* **466**, 6-10.
32. Yin, S. Y., Wei, W. C., Jian, F. Y. and Yang, N. S. 2013. Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2013**, 302426.
33. Yuan, R., Hou, Y., Sun, W., Yu, J., Liu, X., Niu, Y., Lu, J. J. and Chen, X. 2017. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1401**, 19-27.
34. Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. 1999. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549-11556.

초록 : *Millettia erythrocalyx* 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 항암 활성에 관한 연구

진수정¹ · 오유나¹ · 손유리^{1,2} · 최선미² · 권현주^{1,2,3} · 김병우^{1,2,3*}

(¹동의대학교 블루바이오소재개발센터, ²동의대학교 대학원 생명응용학과, ³동의대학교 공과대학 바이오응용공학부)

*Millettia erythrocalyx*는 콩과(Fabaceae)에 속하는 식물로 중국, 태국, 인도 등 열대·아열대 지역에 분포하며, 항바이러스 활성을 보유하고 있다는 보고가 있으나 항산화능과 항암활성 등에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 *M. erythrocalyx*의 에탄올 추출물(EEME)을 사용하여 항산화능을 측정하고, 인체간암세포주인 HepG2에 대한 항암활성과 그 분자적 기전에 관하여 분석하였다. 먼저 DPPH radical scavenging activity를 통해 분석한 결과, EEME의 IC₅₀는 2.74 µg/ml로 뛰어난 항산화능을 보유하고 있음을 확인하였다. 또한 EEME 농도 의존적으로 HepG2 세포의 성장을 억제하였다. EEME의 HepG2 세포 사멸 효과의 기전을 분석하기 위하여 세포주기를 분석한 결과, EEME 농도 의존적으로 SubG1 세포가 증가하였으며, Annexin V 염색과 DAPI 염색을 통해 apoptotic 세포 및 apoptotic body가 증가됨을 확인하였다. 또한 apoptosis 관련 단백질들의 발현변화를 분석한 결과, EEME 처리에 의해 사멸수용체인 Fas와 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현이 증가되었으며, caspase-3, -8, -9가 활성화되고 최종적으로 PARP가 분해되어 apoptosis가 유도되었음을 확인하였다. 이러한 결과들로부터 EEME는 내인성 및 외인성 경로를 통한 apoptosis 유도에 의하여 HepG2 세포의 증식을 억제하는 항암활성을 보유하고 있음을 확인하였다.