

## 아이스플랜트의 항산화 및 HCT116 인체 유래 대장암세포 성장억제 활성\*

서진아, 주지형<sup>†</sup>

충북대학교 식품영양학과

### Antioxidant and growth inhibitory activities of *Mesembryanthemum crystallinum* L. in HCT116 human colon cancer cells\*

Jin A Seo and Jihyeung Ju<sup>†</sup>

Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea

#### ABSTRACT

**Purpose:** This study examined the antioxidant and cancer cell growth inhibitory activities of an ethanol extract and different solvent fractions of *Mesembryanthemum crystallinum* L. (ice plant). **Methods:** The ice plant was freeze-dried, extracted with 99.9% ethanol, and then fractionated with hexane, ethyl acetate, butanol, and water. The total polyphenol content (TPC), total carotenoid content (TCC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging activity (RSA), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) were measured. Assays using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide were performed to measure the intracellular reactive oxygen species (ROS) and cell growth, respectively. Annexin V/propidium iodide staining and cell cycle analysis were performed for the detection of apoptosis and cell cycle arrest. **Results:** TPC, TCC, RSA, and FRAP of the ethanol extract (EE) were 3.7 mg gallic acid equivalent/g, 13.2 µg/g, 21.0% (at a concentration of 5 mg/mL), and 21.0% (at a concentration of 5 mg/mL), respectively. Among the different solvent fractions, the butanol fraction (BF) showed the highest TPC (5.4 mg gallic acid equivalent/g), TCC (86.6 µg/g), RSA (34.9% at 5 mg/mL), and FRAP (80.8% at 5 mg/mL). Treatment of HCT116 human colon cancer cells with EE and BF at concentrations of 250 and 500 µg/mL reduced the levels of intracellular ROS. Concomitantly, EE and BF resulted in the dose-dependent inhibition of cell growth (at the concentrations of 125, 250, and 500 µg/mL for 24 ~ 48 h) and the induction of apoptosis (at the concentrations of 250 and 500 µg/mL for 48 h) in HCT116 cells. An increased G2/M cell population was also found in the BF-treated cells. **Conclusion:** These results suggest that ice plant possesses antioxidant and growth inhibitory activities in colon cancer cells.

**KEY WORDS:** ice plant, reactive oxygen species, cancer cell growth, apoptosis, cell cycle

## 서 론

Ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.)는 번행초과 (Aizoaceae)의 1년생 초목이다. 남아프리카의 나미브 사막에서 유래된 것으로 알려져 있으며 현재는 아프리카 남부, 동서부, 북부, 오스트레일리아 남서부, 아메리카의 서쪽 건조지역 등에서 주로 재배되고 있다 [1]. 잎과 줄기 표면에는 염분을 배출하는 블러더세포 (bladder cell)가 있는데, 염분이 맺힌 모양이 얼음결정처럼 보인다 하여 ice plant라고 불린다 [1]. 아프리카에서는 전통적으로 수분 및 염분을 보충하여 탈수를 예방하기 위하여 섭취되어 왔고,

유럽과 일본에서는 짠맛과 고소한 맛을 동시에 가지고 있는 고 기능성 채소로 각광받아 수십 년 전부터 다양한 음식에 적용되어 왔다 [1]. 최근에는 국내에서도 샐러드, 쌈 채소 등 생으로 섭취되거나 무침, 탕 등의 음식을 조리할 때 첨가되는 등, 그 소비량이 증가하고 있다.

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 쌍을 이루지 못한 전자에 의해 높은 반응성을 획득한 산소 원자나 분자로, 슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide anion radical,  $\cdot O_2^-$ ), 하이드록실 라디칼 (hydroxyl radical,  $\cdot OH$ ), 과산화수소 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ), 일중항산소 (singlet oxygen,  $^1O_2$ ) 등이 있다 [2]. 활성산소종은 체내 정상적인 대사과정

Received: January 11, 2019 / Revised: March 20, 2019 / Accepted: April 3, 2019

\* This work was supported by grants from National Research Foundation of Korea (NRF-2015R1D1A1A01059139).

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-43-261-2681, e-mail: jujih@chungbuk.ac.kr

© 2019 The Korean Nutrition Society

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.

중에 발생하는데, 방사능, 오염물질, 바이러스 등에 노출되거나 술, 담배, 약물, 스트레스 등의 외부적인 요인에 의하여 생성되기도 한다 [2]. 이렇게 생성된 활성산소종이 체내 항산화 체계에 의해 적절하게 제거되지 못하면 산화 스트레스가 유발되어 생체기능을 저하시키며 노화를 촉진하고 암 등 여러 만성질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다 [2]. 이에 인체에 안전한 천연 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

암은 돌연변이로 인해 비정상적인 세포들이 무제한으로 증식하며 정상조직을 침윤하고 체내 다른 조직으로 전이되어 생명을 위협하는 질환을 총칭한다 [3]. 특히 대장암은 전 세계적으로 발병률과 사망률이 모두 높은 암으로 [4], 2017년 국내에서 대장암의 발생률과 사망률은 전체 암 중 각각 1순위, 3순위로 보고되었다 [5]. 암은 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 발병되는데 [3], 위암이나 대장암 같은 소화기계에 생긴 암의 경우 식습관 개선을 통해 약 90%까지 예방 가능하다고 보고되었다 [6]. 이에 항암 활성이 있는 식품 및 성분 관련 연구가 국내·외적으로 활발히 이루어지고 있다 [7].

Ice plant의 활성으로는 항산화 성분 함량 [8,9], radical 소거 활성 [8,10-12],  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 [8,10,11],  $\alpha$ -amylase 저해 활성 [8], nitric oxide 저해 활성 [11], angiotensin converting enzyme 저해 활성 [13], 항균 효과 [12], 고혈당 및 기억력 개선 활성 [14] 등이 보고된 바 있다. Ice plant의 블러더 세포는 D-pinitol, ononitol, myo-inositol 등의 polyol류를 함유하여 항산화 활성 [1,8]을 나타낸다고 보고된 바 있으며, 이중 D-pinitol의 경우 혈당 감소 [11,15], 기억력 개선 [14] 등의 활성 또한 보고된 바 있다. 본 연구에서는 ice plant의 ethanol 추출물과 분획물을 제조하여 항산화 성분 함량 및 활성을 비교·분석하고, 그 중 활성이 높은 분획물을 선별하여 세포 내 활성산소종 소거, 암세포 성장억제, apoptosis 유도, cell cycle 억류 등의 활성을 HCT116 인간 대장암 세포주를 이용하여 *in vitro* 수준에서 조사하고자 하였다.

## 연구방법

### 시료 제조 및 수율 측정

본 실험에 사용한 ice plant는 진성농원 (Pohang, Korea)에서 재배한 것을 구입하였다. 시료는 수세하여 물기를 제거한 후 분쇄 (MR4050 CA, Braun Espanola, Spain)하고 동결건조 (PH1316, IlshinBioBase, Yangju, Korea)하였다. 중량 대비 50배 용량의 99.9% ethanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하고 실온에서 6시간 동안 교

반 (SHO-1D, Daihan Scientific Co., Seoul, Korea)하였다. 이어 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 (MF550, Hanil Science Industry, Seoul, Korea) 및 여과 (F/093, Sigma-Aldrich Co.)한 후 감압농축기 (NB-503CIR, N-Biotek, Bucheon, Korea)로 용매를 휘발하여 ethanol 추출물을 얻었다. 여기에 중량 대비 500배 용량의 3차 증류수와 hexane (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)을 첨가하여 실온에서 2시간 동안 교반 (VORTEX-GENIE2, Scientific Industries, Inc., Oradell, NJ, USA)하였고, 이를 농축 건조하여 hexane 분획물을 획득하였다. 동일한 방법으로 ethyl acetate (Samchun Pure Chemicals Co., Pyeongtaek, Korea), butanol (Junsei Chemical Co.)을 이용하여 순서대로 분획을 실시하여 ethyl acetate 분획물, butanol 분획물을 획득하였다. 마지막으로 남은 층은 동결건조 (PH1316, Ilshin BioBase)하여 water 분획물을 얻었다. 추출물 및 분획물 시료는  $-70^{\circ}\text{C}$  deep freezer (DF8514, IlshinBioBase)에 보관하면서 추후 실험에 사용하였다. 건조 시료의 무게 대비 용매를 완전히 휘발시킨 후 잔여물의 무게로 수율을 산출한 결과, ethanol 추출물의 수율은  $8.4 \pm 0.7\%$ , water, butanol, ethyl acetate, hexane 분획물의 수율은 각각  $5.3 \pm 0.5\%$ ,  $10.2 \pm 0.6\%$ ,  $11.8 \pm 0.6\%$ ,  $4.8 \pm 0.8\%$ 이었다.

### 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법 [16]을 일부 변형하여 측정하였다. Ice plant 추출물 및 분획물 시료 (5 mg/mL) 120  $\mu\text{L}$ 에 Folin Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co.) 60  $\mu\text{L}$ , 7.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  400  $\mu\text{L}$ , 증류수 200  $\mu\text{L}$ 를 혼합하고 실온에서 30분간 교반하였다. 이를 1,200 rpm에서 2분간 원심분리하고 상층액을 취하였다. 이어 plate reader (Imark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 하여 도출된 표준 검량곡선을 이용하여 시료의 총 폴리페놀 함량 (mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract or fraction)을 산출하였다.

### 총 카로티노이드 함량 측정

총 카로티노이드 함량은 Wellburn의 방법 [17]을 일부 변형하여 측정하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO; Biosesang Inc., Seongnam, Korea)를 용매로 한 ice plant 추출물 및 분획물 시료 (5 mg/mL)의 흡광도를 분광광도계 (UV-1601-PC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 470 nm, 647 nm, 663 nm에서 측정하였다. 총 카로티노이드 함량은  $[(1,000 \times A_{470}) + (333.4837 \times A_{663}) - (1,343.057 \times A_{647})] \times 0.909$  식을 이용하여 산출하였다.

### 라디칼 소거활성 측정

Ice plant 추출물 및 분획물의 라디칼 소거활성을 측정하기 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)법 [18]을 이용하였다. 암소에서 준비한 1 mM DPPH (Sigma-Aldrich Co.)와 ice plant 추출물 및 분획물 시료 (5 mg/mL)를 1:1 (v:v)로 혼합하고 30분간 암소에서 반응시킨 후 plate reader (Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 (%)은 [(대조구 흡광도 - 시료 흡광도) / 대조구 흡광도] × 100 식을 이용하여 산출하였다.

### 철 환원력 측정

Ice plant 추출물 및 분획물의 철 환원력을 평가하기 위하여 Benzie와 Strain의 방법 [19]을 일부 변형하여 측정하였다. 먼저 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM 2,4,6-tripyridyls-triazine, 증류수에 용해시킨 20 mM FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O를 사용 직전에 10:1:1 (v:v:v)의 비율로 혼합하였다. 이어 이렇게 제조된 혼합액 300 µL에 ice plant 추출물 및 분획물 시료 (5 mg/mL) 200 µL를 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 plate reader (Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 철 환원력 (%)은 (시료 흡광도 / 대조구 흡광도) × 100 식을 이용하여 산출하였고, 이때 대조구는 시료와 같은 농도의 ascorbic acid (Samchun Pure Chemicals Co.)를 이용하였다.

### 대장암세포 배양

HCT116 인간 대장암 세포 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (Welgene Inc., Daegu, Korea)를 함유한 McCoy's 5A 배지 (Gibco, Rockville, MD, USA)를 이용하여 배양 (37°C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub>)하였다.

### 세포 내 활성산소종 측정

대장암 세포 내 활성산소종 수준은 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)를 이용하는 방법 [20]으로 측정하였다. 세포 배양용 96-well black plate (Corning Inc., Corning, NY, USA)에 HCT116 세포 (3 × 10<sup>4</sup> cell/well)를 분주하고, 24시간 후 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 함유한 serum-complete 배지로 교체하여 48시간 동안 처리하였다. 시료는 실험 직전 DMSO (Biosesang Inc.)에 녹여 고농도 (500 mg/mL)로 제조한 후 배지를 이용하여 실험에 적합한 농도로 희석하였다. 최종적으로 세포에 처

리되는 DMSO (Biosesang Inc.) 농도는 세포 생존 정도에 영향이 없는 0.4% (v/v) 이하로 조절하였다. 이후 상층액을 제거하고 PBS에 녹인 20 µM DCFH-DA (Sigma-Aldrich Co.)를 well에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 30분간 incubation 한 후 PBS로 2번 세척하였다. DCFH-DA와 세포 내 활성 산소종이 반응하여 형광물질인 2',7'-dichloro-fluorescein (DCF)로 전환된 정도를 형광분석기 (FLx800, Biotek, Seoul, Korea)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 528 nm의 파장에서 측정하였다.

### 세포 생존 측정

대장암 세포의 생존 정도는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 이용하는 방법 [21]으로 측정하였다. 세포 배양용 96-well plate (Corning Inc.)에 HCT116 세포 (1 × 10<sup>4</sup> cell/well)를 분주하고, 24시간 후 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 125, 250, 500 µg/mL 농도로 함유한 serum-free 배지를 첨가하여 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 이후 0.5 mg/mL의 MTT (Sigma-Aldrich Co.)를 함유한 배지로 교체하고 2시간 동안 37°C에서 incubation 하였다. 환원된 formazan dye는 배지를 제거한 후 DMSO (Biosesang Inc.)를 첨가하여 용해시켰다. 이어 plate reader (Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 ice plant ethanol 추출물 또는 butanol 분획물이 처리된 세포의 생존 정도는 대조구의 생존 정도에 대비하여 %로 나타내었다.

### Apoptosis 측정

Apoptosis는 annexin V 염색법 [22]으로 측정하였다. 세포 배양용 6-well plate (Corning Inc.)에 HCT116 대장암세포 (1 × 10<sup>5</sup> cells/well)를 분주하고 24시간 후 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 250, 500 µg/mL 농도로 함유한 serum-complete 배지를 이용하여 48시간 동안 처리하였다. 이어 세포를 well에서 분리시키고 PBS로 1회 세척 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-annexin V apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 제공하는 1X binding buffer에 현탁하였다. 이어 1 × 10<sup>5</sup> cells/100 µL에 propidium iodide (PI) (BD Biosciences) 5 µL와 FITC-annexin V (BD Biosciences) 5 µL를 넣고 상온에서 빛을 차단하면서 반응시킨 뒤 flow cytometer (BD FACSCalibur, BD Biosciences)에서 CellQuest Pro. (BD Biosciences)를 이용하여 전체 세포 중 annexin V가 양성 염색된 세포의 비율을 측정하였다.

## 세포주기 분석

세포주기는 Irons 등 [23]이 보고한 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 먼저 세포 배양용 6-well plate (Corning Inc.)에 HCT116 대장암세포 ( $3 \times 10^5$  cells/well)를 분주하고 24시간 동안 세포를 부착시킨 후 세포주기 동일화를 위하여 serum-free 배지로 교환하고 24시간 동안 다시 배양하였다. 이어 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 함유한 serum-complete 배지를 48시간 동안 처리하고, well에서 분리시킨 세포를 PBS로 1회 세척 후 70% 에탄올을 이용하여 4°C에서 고정하였다. PBS로 1회 세척 후 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich Co.)와 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 RNase (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하고 30분간 incubation한 후 flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences)에서 CellQuest Pro. (BD Biosciences)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

## 통계분석

통계분석은 SPSS Statistics (ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였고, 모든 결과 값은 3회 이상 분석하여  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 로 나타내었다. 세 군 이상의 결과를 비교하기 위해서는 one-way ANOVA를 이용하여 분석한 후,  $p < 0.05$ 일 때 사후 분석으로 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 두 군 간의 결과를 비교하기 위해서는 two-tailed Student's t-test를 이용하여 분석한 후,  $p < 0.05$ 일 때 유의적인 차이가 있다고 판단하였다. Ice plant 추출물 및 분획물의 항산화 성분과 항산화 활성의 상관관계, 세포 내 활성산소종 소거활성과 암세포 생존 억제활성의 상관관계가 있는지를 평가하기 위해서 Pearson's correlation analysis를 실시하였고,  $p < 0.05$ 일 때 유의적인 상관관계가 있다고 판단하였다. Ice plant 추출물 및 분획물의 활성이 처리 농도에 의존적이었는지를 평가하기 위해서 선형 및 곡선형 회귀분석을 실시하였고,  $p < 0.05$ 일 때 유의적인 농도 의존적 활성이 있다고 판단하였다.

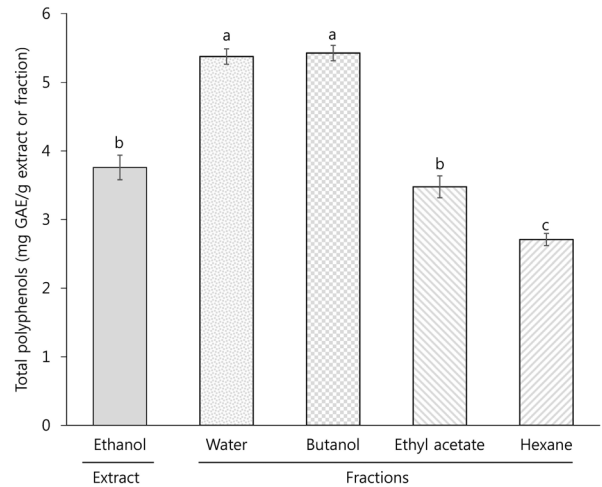
## 결 과

### 총 폴리페놀 및 총 카로티노이드 함량

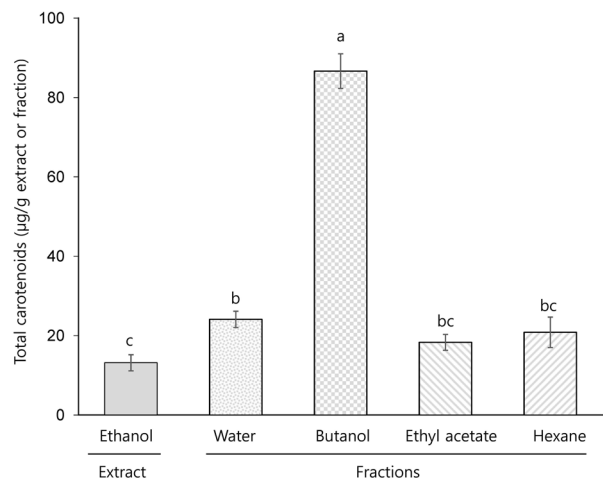
폴리페놀은 벤젠고리의 수소 중 2개 이상이 수산기로 치환된 구조를 가지는 항산화 물질로 식물의 광합성 작용에 의해 생성된 당의 일부가 변화한 2차 대사산물이다 [24]. Ice plant ethanol 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid을 표준물질로 하여 표준곡선을 그려서 산출하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같다. Ethanol 추출물의 총 폴리페

놀 함량은 3.7 mg GAE/g이었는데, 이에 비하여 butanol 분획물, water 분획물의 함량 (각각 5.4 mg GAE/g, 5.3 mg GAE/g)은 높았고, ethyl acetate 분획물의 함량 (3.4 mg GAE/g)은 비슷하였으며, hexane 분획물의 함량 (2.7 mg GAE/g)은 낮았다 ( $p < 0.05$ ).

카로티노이드는 동식물계에 널리 분포된 황색, 주황색, 적색을 나타내는 지용성 색소로 isoprene 구조가 결합된 화합물이다 [24]. Ice plant ethanol 추출물 및 분획물의 총 카로티노이드 함량은 Fig. 2와 같다. Ethanol 추출물의 총



**Fig. 1.** Total polyphenol levels of ethanol extract and different solvent fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. GAE: gallic acid equivalent. All values are presented as mean  $\pm$  SEM of  $\geq 3$  determinations. Different letters (a-c) mean significant difference among different samples by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Total carotenoid levels of ethanol extract and different solvent fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. All values are presented as mean  $\pm$  SEM of  $\geq 3$  determinations. Different letters (a-c) mean significant difference among different samples by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

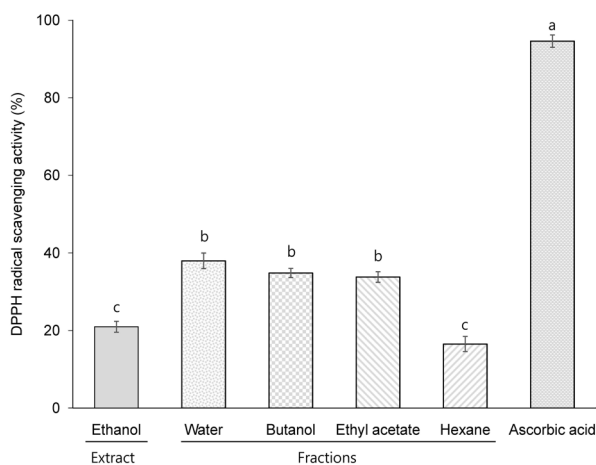
카로티노이드의 함량은 13.2 µg/g이었고, 이에 비하여 butanol 분획물, water 분획물의 함량 (각각 86.6 µg/g과 24.1 µg/g)은 높았으며 특히 butanol 분획물의 함량이 현저하게 높았다 ( $p < 0.05$ ). Hexane 분획물이나 ethyl acetate 분획물의 총 카로티노이드 함량 (각각 20.8 µg/g, 18.3 µg/g)은 ethanol 분획물의 함량과 유의적으로 다르지 않은 비슷한 수준을 나타내었다.

### 라디칼 소거활성

DPPH 자유 라디칼은 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 환원되면서 보라색에서 노란색으로 변하는데, 이러한 원리를 이용하여 물질의 항산화 활성을 측정하는 방법 [18]이 널리 이용되고 있다. Ice plant ethanol 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Fig. 3과 같다. Ethanol 추출물 (5 mg/mL)의 DPPH 라디칼 소거활성은 21.0%였는데 양성대조군인 ascorbic acid (5 mg/mL)의 활성 (94.6%)에 비해서는 낮은 수준이었다. Ethanol 추출물과 분획물 간의 DPPH 라디칼 소거활성을 비교하였을 때, ethanol 추출물의 활성에 비해 water 분획물, butanol 분획물, ethyl acetate 분획물의 활성 (각각 38.0%, 34.9%, 33.8%)은 높았고, hexane 분획물의 활성 (16.5%)은 비슷하였다 ( $p < 0.05$ ). Ice plant 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 앞서 측정한 항산화 성분 중 총 폴리페놀 함량과 유의적인 양의 상관관계 ( $R = 0.705$ ,  $p < 0.01$ )를 나타내었다.

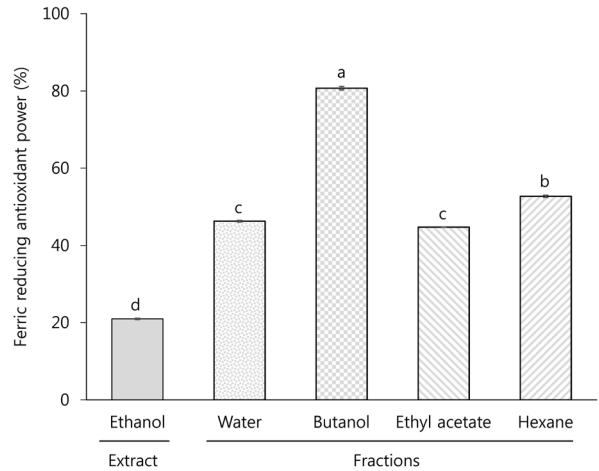
### 철 환원력

$Fe^{3+}$ 는 항산화 물질에 의하여  $Fe^{2+}$ 로 환원되는데, ice

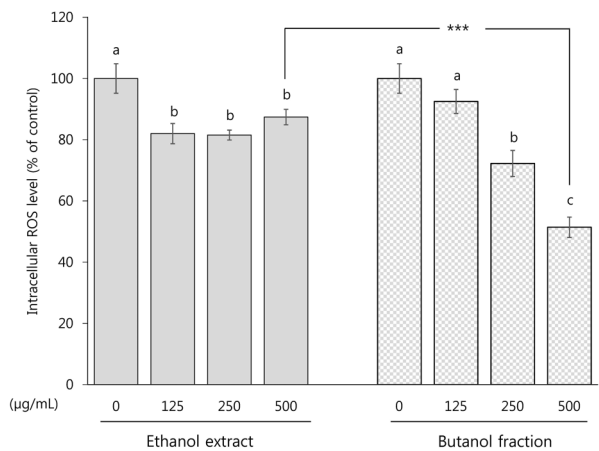


**Fig. 3.** DPPH radical scavenging activity of ethanol extract and different solvent fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. All values are presented as % of the control in the mean  $\pm$  SEM of 3 determinations. Different letters (a-c) mean significant difference among different samples by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

plant ethanol 추출물 및 분획물의 철환원력을 평가하기 위하여 Benzie와 Strain의 방법 [19]을 일부 변형하여 측정하였다. Ice plant ethanol 추출물 및 분획물의 철 환원력은 Fig. 4와 같다. Ice plant ethanol 추출물 (5 mg/mL)의 철 환원력은 21.0%이었는데, 이에 비하여 butanol 분획물, hexane 분획물, water 분획물 ethyl acetate 분획물의 철 환원력 (각각 80.8%, 52.7%, 46.3%, 44.7%)이 높았고, 특히 butanol 분획물의 철 환원력이 현저하게 높았다 ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Ferric reducing antioxidant power of ethanol extract and different solvent fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. All values are presented as % of the control in the mean  $\pm$  SEM of 3 determinations. Different letters (a-d) mean significant difference among different samples by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Intracellular ROS scavenging activity of ethanol extract and butanol fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. in HCT116 colon cancer cells. HCT116 cells were treated with ethanol extract and butanol fraction at the concentrations of 125, 250, and 500 µg/mL for 48 h. All values are presented as mean  $\pm$  SEM of  $\geq 3$  determinations. Different letters (a-c) mean significant difference among different concentrations by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Asterisks mean statistical difference between two different sample at a respective concentration by two-tailed student t-test ( $*** p < 0.001$ ).

Ice plant 추출물 및 분획물의 철 환원력은 총 카로티노이드 함량과 유의적인 양의 상관관계 ( $R = 0.875, p < 0.01$ )를 나타내었다.

### 세포 내 활성산소종 소거활성

DCFH-DA는 세포막을 투과한 후 세포 내에 존재하는 활성산소종에 의하여 형광성 DCF로 전환되는데, 이러한 원리를 이용하여 세포 내 활성산소종 수준을 측정하는 방법 [20]이 널리 이용되고 있다. Ice plant의 ethanol 추출물과 분획물이 나타낸 시험관 수준의 항산화 효과가 실제 살아있는 세포 내에서도 재현되는지 여부를 HCT116 대장암 세포를 이용하여 조사하였다. 분획물 중에서는 총 폴리페놀 함량, 총 카로티노이드 함량, 라디칼 소거활성, 철 환원력이 모두 높았던 butanol 분획물을 선택하였다. HCT116 대장암세포에 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 125, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$  농도로 48시간 동안 처리한 후 세포 내 활성산소종 수준을 대조구 수준에 대비하여 %로 나타낸 결과는 Fig. 5와 같다. Ethanol 추출물의 경우 모든 농도에서 세포 내 활성산소종 수준을 유의적으로 감소시켰으나 (대조구 대비 13~18%) ( $p < 0.01$ ), 농도의존적인 활성은 나타나지 않았다. Butanol 분획물의 경우 250  $\mu\text{g/mL}$ 과 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 세포 내 활성산소종 수준을 유의적으로 감소시켰고 (대조구 대비 28~49%) ( $p < 0.001$ ), 선형, 2차곡선, 지수형 회귀분석을 실시한 결과 처리 농도와 세포 내 활성산소종 감소 정도 간에 유의한 상관관계 ( $R^2 > 0.9, p < 0.001$ )가 나타나 농도의존적 활성이 관찰되

었다. Ethanol 추출물과 butanol 분획물의 세포 내 활성산소종 소거활성을 비교하였을 때, 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 butanol 분획물의 활성 (대조구 대비 49%)이 ethanol 추출물의 활성 (대조구 대비 13%)보다 유의적으로 컸다 ( $p < 0.001$ ).

### 암세포 성장억제 활성

활성산소종은 암세포의 증식을 증가시켜 암화과정의 촉진단계에 기여하는 것으로 알려져 있고 [25], 무제한적인

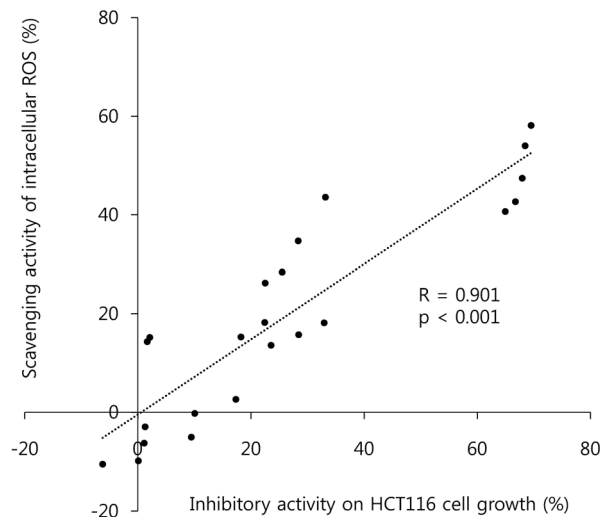


Fig. 7. Correlation between intracellular ROS scavenging activity and growth inhibitory activities of the butanol fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. in HCT116 colon cancer cells. Pearson's correlation analysis was performed.

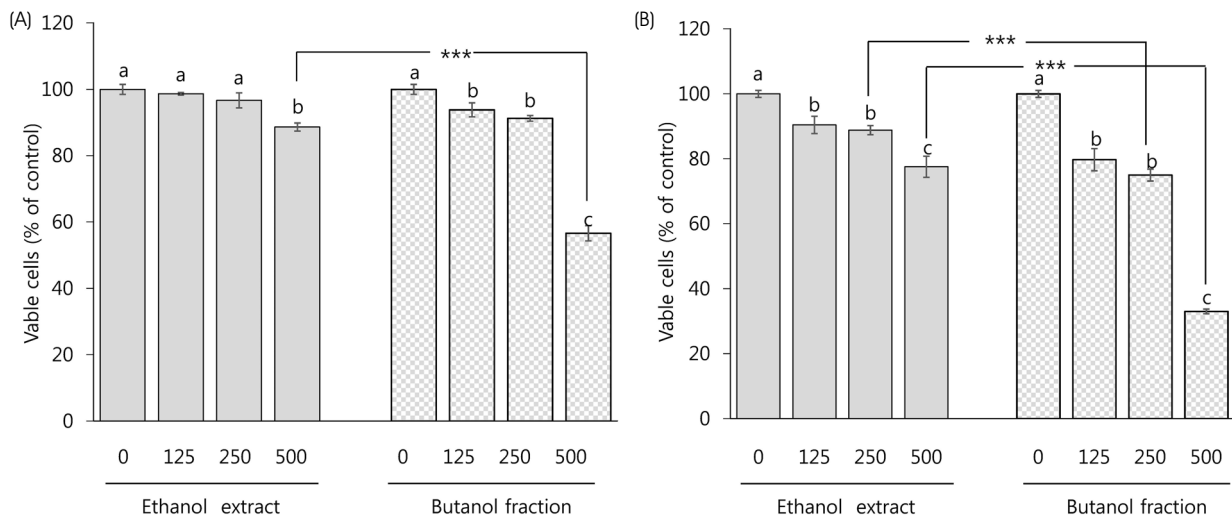
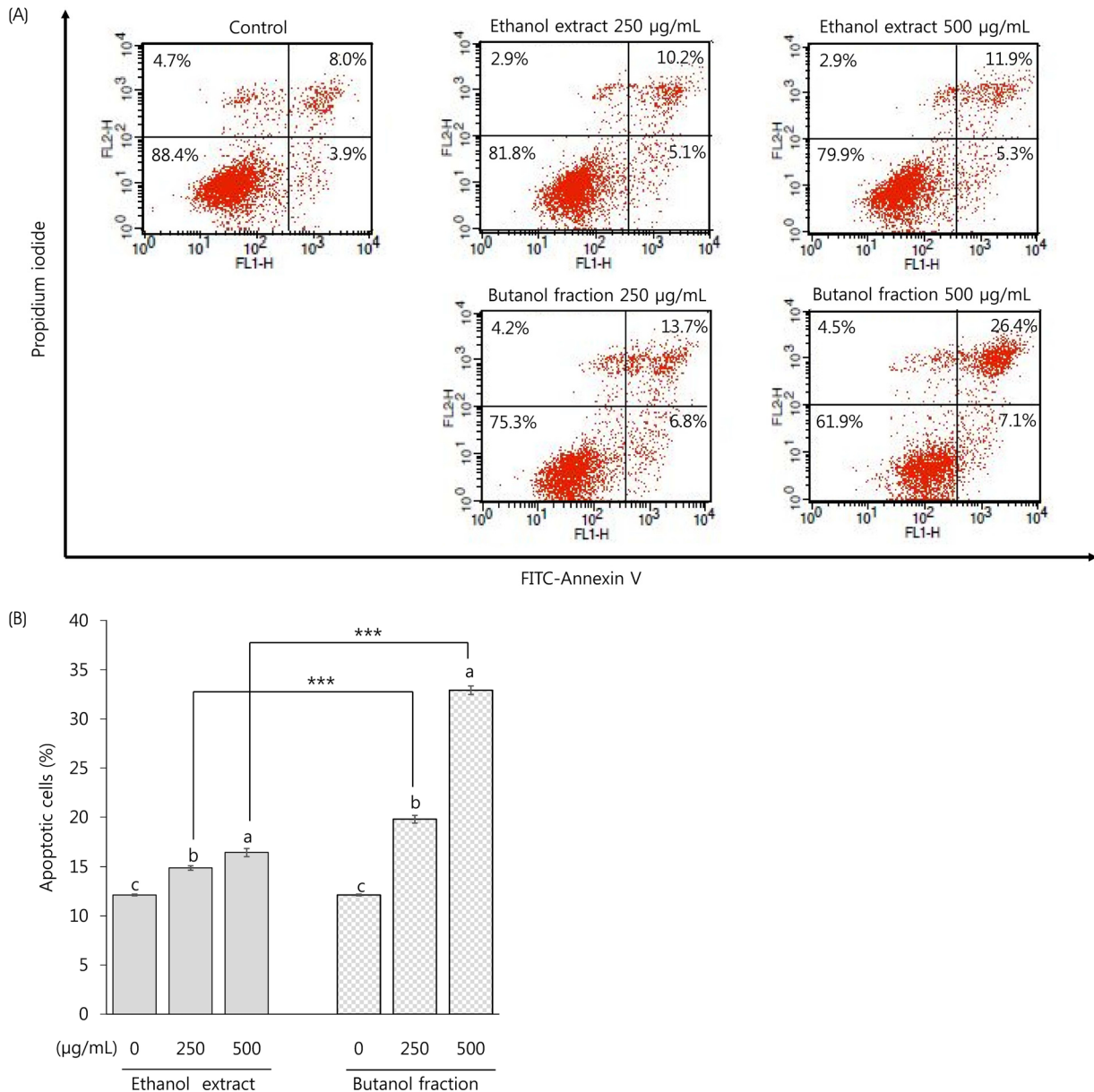


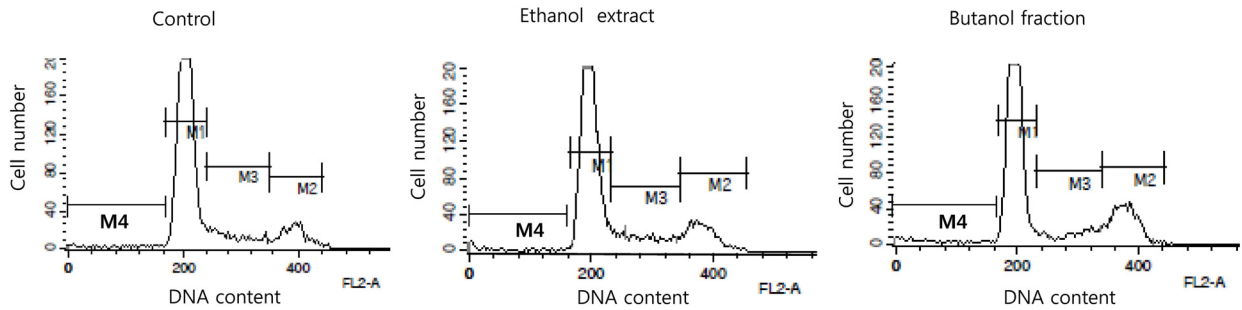
Fig. 6. Growth inhibitory activities of ethanol extract and butanol fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. in HCT116 colon cancer cells. HCT116 cells were treated with ethanol extract and butanol fraction at the concentrations of 125, 250, and 500  $\mu\text{g/mL}$  for 24 h (A) and 48 h (B). All values are presented as mean  $\pm$  SEM of  $\geq 3$  determinations. Different letters (a-c) mean significant difference among different concentrations by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Asterisks mean statistical difference between two different sample at a respective concentration by two-tailed student t-test (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

증식은 암세포가 정상세포와 구별되는 가장 기본적인 특징 [26]이기 때문에, 본 연구에서는 ice plant ethanol 추출물과 butanol 분획물의 항산화 활성에 이어 대장암세포 성장 억제활성을 HCT116 세포를 이용하여 조사하였다. HCT116 세포에 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 125, 250, 500 µg/mL 농도로 24시간 또는 48시간 동안 처리한 후 세포의 생존 정도를 대조구 세포의 생존 정도에

대비하여 %로 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. Ethanol 추출물이 500 µg/mL 농도로 24시간 처리된 세포의 생존률은 대조구 대비 89%, 125, 250, 500 µg/mL 농도로 48시간 처리된 세포의 생존률은 대조구 대비 78~90%이었고 ( $p < 0.001$ ), 회귀분석 결과 48시간 시점에서 유의미한 농도의 존적 활성이 나타났다 ( $R^2 > 0.9$ ,  $p < 0.001$ ). Butanol 분획물을 125, 250, 500 µg/mL 농도로 24시간 또는 48시간 처



**Fig. 8.** Apoptosis-inducing activity of ethanol extract and butanol fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. in HCT116 colon cancer cells. HCT116 cells were treated with ethanol extract and butanol fraction at the concentrations of 250 and 500 µg/mL for 48 h. Representative histogram (A) and bar chart (B) of annexin/PI double staining assay. All values are presented as mean ± SEM of ≥3 determinations. Different letters (a-c) mean significant difference among different concentrations at a respective sample by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Asterisks mean statistical difference between two different samples at a respective concentration by two-tailed student t-test ( $*** p < 0.001$ ).



**Fig. 9.** Representative cell cycle of HCT116 colon cancer cells after the treatments of ethanol extract and butanol fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L. HCT116 cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were treated with ethanol extract or butanol fraction at the concentrations of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48h. M1: G0/G1 phase; M2: G2/M phase; M3: S phase; M4: sub-G1 phase.

**Table 1.** Cell cycle distribution of HCT116 colon cancer cells after the treatment of ethanol extract and butanol fraction prepared from *Mesembryanthemum crystallinum* L.

Treatment	% of cell			
	Sub G1	G0/G1	S	G2/M
Control	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>b1)</sup>	77.4 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	8.2 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	12.7 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
Ethanol extract	2.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	70.2 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	12.1 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	15.7 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>
Butanol fraction	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	72.0 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	8.8 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	17.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>

1) Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 4 determinations. Different letters (a, b) mean significant difference among different samples at a respective cell cycle by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

리된 세포의 생존률은 대조구의 생존 정도에 대비하여 각각 57~94%와 33~80%이었고 ( $p < 0.001$ ), 두 시점에서 모두 농도의존적 활성이 나타났다 ( $R^2 = 0.7 \sim 0.9$ ,  $p < 0.001$ ). Ethanol 추출물과 butanol 분획물의 대장암세포 성장 억제활성을 비교하였을 때, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 24시간 처리 시와 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 48시간 처리 시에 butanol 분획물의 세포 성장 억제활성이 ethanol 추출물의 활성보다 높았다 ( $p < 0.001$ ). 한편 butanol 분획물의 HCT116 대장암세포 성장 억제활성은 앞서 기술한 바 있는 세포 내 활성산소종 소거활성과 유의적인 양의 상관관계를 나타내었다 (Fig. 7,  $R = 0.901$ ,  $p < 0.001$ ).

### Apoptosis 유도 활성

암세포에서는 apoptosis라고 불리는 세포자살 프로그램이 정상적으로 작동되지 않아 잘 사멸되지 않고 비정상적으로 높은 증식률을 가진다 [27]. 앞서 기술한 ice plant ethanol 추출물과 butanol 분획물에 의한 HCT116 대장암세포의 성장 억제가 apoptosis 유도와 관련이 있는 것인지 알아보기 위하여 HCT116 대장암세포에 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 48시간 동안 처리한 결과는 Fig. 8과 같다. Ethanol 추출물 또는 butanol 분획물이 처리된 세포에서 annexin V로 양성 염색되어 apoptosis가 일어났다고 판단된 비율은 15~33%로 대조구 세포에서 apoptosis가 일어난 비율 (12%)보다 높았고 ( $p <$

0.05), butanol 분획물의 apoptosis 유도 활성 (대조구 대비 1.6~2배)이 ethanol 추출물의 활성 (대조구 대비 1.2~1.4배)보다 높았다 ( $p < 0.05$ ).

### 세포 주기 변화

Ice plant ethanol 추출물과 butanol 분획물이 HCT116 세포의 주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HCT116 대장암세포에 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 ethanol 추출물 또는 butanol 분획물을 48시간 동안 처리한 결과는 Fig. 9와 Table 1과 같다. Ethanol 추출물이 처리된 세포의 sub-G1기 비율 (2.3%)과 butanol 분획물이 처리된 세포의 sub-G1기 비율 (2.4%)은 대조구 세포의 sub-G1기 비율 (1.7%)의 1.4배로 유의적으로 높은 수준을 나타내었다 ( $p < 0.05$ , Table 1, Fig. 9). 또한 butanol 분획물이 처리된 세포의 G2/M기 비율 (17%)은 대조구 세포의 G2/M기 비율 (12%)의 1.4배로 유의적으로 높은 수준을 나타내었다 ( $p < 0.05$ , Table 1, Fig. 9).

### 고찰

본 연구는 ice plant 추출물 및 분획물의 항산화 성분 함량, 활성을 비교·분석하고, 세포 내 활성산소종 소거활성, 암세포 성장억제 활성, apoptosis 유도 활성, cell cycle에 미치는 영향 등을 HCT116 인간 대장암 세포주를 이용하



여 *in vitro* 수준에서 평가하는 것을 목적으로 하였다.

폴리페놀과 카로티노이드는 식물성 식품에 광범위하게 함유되어 있는 대표적인 항산화 성분 [28]이다. 본 연구에서 ice plant ethanol 추출물의 총 폴리페놀과 총 카로티노이드 함량은 각각 3.7 mg GAE/g (Fig. 1)과 13.2 µg/g (Fig. 2)으로 측정되었는데, 이는 Ibtissem 등 [12]이 보고한 ice plant 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량 (23.9 mg GAE/g)이나 Amari 등 [9]이 보고한 ice plant 80% 아세톤 추출물의 카로티노이드 함량 (46 µg/g)보다는 낮은 수준이었다. 폴리페놀의 경우 일반적으로 배당체로 존재하는 경우가 많아 극성용매에 잘 녹기 때문에 [29] 추출 시 물을 이용한 기존 연구에서 검출된 함량보다 추출 시 에탄올을 이용한 본 연구에서 검출된 함량이 낮았던 것으로 추측되며, 카로티노이드의 경우 지용성이기 때문에 아세톤을 이용한 기존 연구에서 검출된 함량보다 에탄올을 이용한 본 연구에서 검출된 함량이 낮았던 것으로 생각된다. 본 연구에서 제조한 분획물 중 butanol 분획물의 총 폴리페놀 함량 (5.4 mg GAE/g)은 ethanol 추출물, ethyl acetate 분획물, hexane 분획물의 함량 (각각 3.7 mg, 3.4 mg, 2.7 mg GAE/g)보다 높았는데 (Fig. 1), 이는 Kang 등의 연구 [8]에서 ice plant methanol 추출물로부터 제조된 분획물의 총 폴리페놀 함량을 비교한 결과 butanol 분획물의 총 폴리페놀 함량이 hexane 분획물의 함량보다 높았다고 보고된 것과 부분적으로 비슷하였다.

이어서 ice plant 추출물 및 분획물의 시험관 수준의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거활성과 철 환원력을 측정하였다. Ethanol 추출물 (5 mg/mL)의 DPPH 라디칼 소거활성과 철 환원력은 동일하게 21.0%이었다 (Fig. 3 & 4). Lee 등 [11]의 연구에서는 ice plant ethanol 추출물 (400 µg/mL)의 DPPH 라디칼 소거활성이 51.3%로 보고된 바 있어 본 연구에서 다소 낮은 DPPH 라디칼 소거활성이 측정되었다. 이러한 연구 결과 간의 차이는 각 연구마다 이용된 ice plant의 재배 조건, 수확 시기, DPPH와 추출물의 혼합 비율 등이 다른 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 제조한 분획물 중 butanol 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성과 철 환원력은 각각 34.9%와 80.8%로 ethanol 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성과 철 환원력 (21.0%와 21.0%)보다 높았는데 (Fig. 3 & 4), 이는 Seo와 Kim [30]이 보고한 여정실의 항산화 활성 연구에서 여정실 분획물 중 butanol 분획물이 다른 분획물에 비해 철 환원력이 현저하게 높았다고 보고한 결과와 비슷하였다. 본 연구에서 ice plant 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 총 폴리페놀 함량과 양의 상관관계 ( $R = 0.705$ ,  $p < 0.01$ )를, 철 환원력은 총 카로티노이드 함량

과 양의 상관관계 ( $R = 0.875$ ,  $p < 0.01$ )를 나타내었다. 이는 Jeon 등 [31]과 Pak 등 [32]의 연구에서 DPPH 라디칼 소거활성과 총 폴리페놀 함량 간 양의 상관관계가 보고된 결과나, Kim 등 [33]의 연구에서 식용봄꽃 중 카로티노이드 함량이 높았던 개나리, 벚꽃 등의 경우 철 환원력이 높게 나타난 결과, Lee 등 [34]의 연구에서 영굴 성숙과가 미성숙과에 비하여 카로티노이드 함량과 철 환원력이 높게 나타난 결과 등과 비슷하였다.

다음으로는 ice plant의 ethanol 추출물과 분획물이 나타난 시험관 수준의 항산화 효과가 실제 살아있는 암세포 내에서도 재현되는지 여부를 조사하였다. 암세포는 정상세포와 비교하여 볼 때 활성산소종 생성 증가와 이로 인한 항산화 방어체계에 대한 의존도 증가와 같은 특징을 가진다 [35]. 본 연구에서 인체 유래 대장암세포주인 HCT116를 이용하여 조사한 결과, ethanol 추출물과 butanol 분획물 모두 세포 내 활성산소종 수준을 유의적으로 감소시키는 효과가 있었고 (각각 대조구 대비 13 ~ 18%, 28 ~ 49%,  $p < 0.01$ , Fig. 5), butanol 분획물의 세포 내 활성산소종 소거활성 (500 µg/mL 농도 처리 시 대조구 대비 49%)이 ethanol 추출물의 활성 (500 µg/mL 농도 처리 시 대조구 대비 13%)보다 유의적으로 컸다 ( $p < 0.001$ , Fig. 5). 이러한 결과는 butanol 분획물이 ethanol 추출물보다 시험관 수준의 항산화 활성뿐만 아니라 세포 내에서 활성산소종을 소거하는 *in vitro* 수준의 항산화 활성 또한 높은 것을 나타낸다. 이는 Kang과 Hong의 연구 [36]에서 라디칼 소거활성이 높았던 통통마디 에틸아세테이트 분획물이 세포 내 활성산소종 소거활성 또한 높았다고 보고된 결과와 유사하였다.

무제한적인 증식은 암세포가 정상세포와 구별되는 가장 기본적인 특징 [26]으로, ethanol 추출물과 butanol 분획물의 대장암세포 성장 억제활성을 HCT116 세포를 이용하여 조사하였다. Ethanol 추출물은 48시간 시점에서, butanol 분획물은 24시간 또는 48시간 시점에서 각각 처리 농도 (125 ~ 500 µg/mL)에 의존적인 세포 성장 억제 활성을 나타내었다 ( $R^2 = 0.7 \sim 0.9$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 6). Butanol 분획물의 세포 성장 억제활성은 ethanol 추출물의 활성보다 유의적으로 높았는데 (500 µg/mL 농도로 24시간 처리 시, 250 µg/mL과 500 µg/mL 농도로 48시간 처리 시,  $p < 0.001$ ), 이러한 결과로 볼 때 butanol 분획물은 산화스트레스를 억제하는 데 있어서 뿐만 아니라 대장암세포의 성장을 억제하는데 있어서도 ethanol 추출물보다 효과적인 것으로 생각된다. 또한 butanol 분획물의 HCT116 대장암세포 성장 억제활성은 앞서 기술한 바 있는 세포 내 활성산소종 소거활성과 양의 상관관계를 나타내었는데 (Fig. 7,

R = 0.901,  $p < 0.001$ ), 이는 세포 내 활성산소종 소거활성이 높은 분획물이 PC3 전립선암세포 성장 억제활성 또한 높았다고 보고한 Lee 등 [37]의 결과와 유사하였다. 활성산소종은 암세포의 증식을 증가시켜 암화과정의 촉진단계에 기여하는 것으로 알려져 있으므로 [25], 본 연구에서 관찰된 butanol 분획물의 대장암세포 성장 억제활성은 부분적으로 항산화 활성으로부터 기인되었을 것으로 추측된다.

암세포는 결합이 일어나도 apoptosis에 의해 잘 사멸되지 않고 정상적인 세포주기 조절에서 벗어나 비정상적으로 증식하는 특징을 가진다 [27]. 본 연구에서는 ethanol 추출물과 butanol 분획물의 HCT116 대장암세포 성장 억제활성이 apoptosis 유도활성이나 세포주기 억류활성 등과 관련이 있는지 조사하였다. Annexin V로 염색된 세포 비율 (Fig. 8)과 sub-G1기에 있는 세포 비율 (Table 1)을 분석한 결과에서, ethanol 추출물과 butanol 분획물의 apoptosis 유도활성 (대조구 대비 1.2~2배)이 관찰되었다. 이러한 결과로 볼 때 ice plant ethanol 추출물과 butanol 분획물에 의한 HCT116 대장암세포의 성장억제 활성은 부분적으로 apoptosis 유도활성으로부터 기인된 것으로 생각된다. 특히 butanol 분획물의 apoptosis 유도활성이 ethanol 추출물의 활성보다 더 컸고 (Fig. 8) butanol 분획물만이 G2/M기 억류활성을 나타냈기 때문에 (Fig. 9 & Table 1). 대장암세포의 성장을 억제하는데 있어서 butanol 분획물이 ethanol 추출물보다 더 효과적이었던 것 (Fig. 6)으로 생각된다. 앞으로 apoptosis를 유도하고 G2/M기 정체를 유발하는 butanol 분획물에 함유된 활성 성분을 분리·동정하고 이러한 활성과 관련된 세부기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 ice plant의 ethanol 추출물과 분획물의 항산화 및 대장암세포 성장억제 활성을 *in vitro* 수준에서 평가하는 것을 목적으로 하였다. Ethanol 추출물의 총 폴리페놀 함량 (3.7 mg GAE/g), 총 카로티노이드 함량 (13.2 µg/g), DPPH 라디칼 소거활성 (21.0%), 철 환원력 (21.0%) 보다 butanol 분획물의 총 폴리페놀 함량 (5.4 mg GAE/g), 총 카로티노이드 함량 (86.6 µg/g), DPPH 라디칼 소거활성 (34.9%), 철 환원력 (80.8%)이 더 높았다. 또한 HCT116 대장암세포에서 세포 내 활성산소종 수준을 감소시키거나 세포 성장을 억제하는데 있어서 ethanol 추출물보다 butanol 분획물의 활성이 더 컸다. 대장암세포의 성장을 억제하는데 있어서 butanol 분획물이 ethanol 추출물보다 더 효과적

이었던 것은 butanol 분획물의 apoptosis 유도활성이 ethanol 추출물의 활성보다 더 컸고 butanol 분획물만이 G2/M기 억류활성을 나타냈기 때문인 것으로 생각된다. 앞으로 이와 같은 결과를 초래하는 주요 활성성분을 분리·동정하고 ice plant의 항산화 활성 및 대장암세포 성장억제 효과가 *in vivo* 수준에서 재현되는지 검증하며 이와 관련된 세부기전을 탐색하는 심도 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## ORCID

서진아: <https://orcid.org/0000-0002-9418-3295>

주지형: <https://orcid.org/0000-0003-4374-4846>

## References

1. Agarie S, Kawaguchi A, Kodera A, Sunagawa H, Kojima H, Nose A, et al. Potential of the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a new high-functional food as evaluated by polyol accumulation. *Plant Prod Sci* 2009; 12(1): 37-46.
2. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
3. Kleinsmith LJ. *Principles of cancer biology*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2006.
4. Statistics Korea. *Causes of death statistics in 2011*. Daejeon: Statistics Korea; 2012.
5. Jung KW, Won YJ, Oh CM, Kong HJ, Lee DH, Lee KH. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2017. *Cancer Res Treat* 2017; 49(2): 306-312.
6. Boyle P, Levin B. *World cancer report 2008*. Geneva: International Agency for Research on Cancer; 2008.
7. McCullough ML, Giovannucci EL. Diet and cancer prevention. *Oncogene* 2004; 23(38): 6349-6364.
8. Kang S, Kim S, Ha S, Lee C, Nam S. Biochemical components and physiological activities of ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2016; 45(12): 1732-1739.
9. Amari T, Ghnaya T, Debez A, Taamali M, Ben Youssef N, Lucchini G, et al. Comparative Ni tolerance and accumulation potentials between *Mesembryanthemum crystallinum* (halophyte) and *Brassica juncea*: metal accumulation, nutrient status and photosynthetic activity. *J Plant Physiol* 2014; 171(17): 1634-1644.
10. Nam S, Kang S, Kim S, Ko K. Effect of fermented ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) extracts against antioxidant, antidiabetic and liver protection. *J Life Sci* 2017; 27(8): 909-918.
11. Lee SY, Choi HD, Yu SN, Kim SH, Park SK, Ahn SC. Biological activities of *Mesembryanthemum crystallinum* (ice

- plant) extract. *J Life Sci* 2015; 25(6): 638-645.
12. Ibtissem B, Abdelly C, Sfar S. Antioxidant and antibacterial properties of *Mesembryanthemum crystallinum* and *Carpobrotus edulis* extracts. *Adv Chem Eng Sci* 2012; 2(3): 359-365.
  13. Kang SM, Kim SJ, Nam S. Inhibitory effect of cell differentiation against 3T3-L1 pre-adipocytes and angiotensin converting enzyme (ACE) activity of ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2017; 46(8): 1012-1017.
  14. Lee BH, Lee CC, Wu SC. Ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*) improves hyperglycaemia and memory impairments in a Wistar rat model of streptozotocin-induced diabetes. *J Sci Food Agric* 2014; 94(11): 2266-2273.
  15. Bates SH, Jones RB, Bailey CJ. Insulin-like effect of pinitol. *Br J Pharmacol* 2000; 130(8): 1944-1948.
  16. Singleton VL, Rossi JA Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16(3): 144-158.
  17. Wellburn AR. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 1994; 144(3): 307-313.
  18. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol* 1995; 28(1): 25-30.
  19. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-76.
  20. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(5-6): 612-616.
  21. Kwak Y, Ju J. Inhibitory activities of *Perilla frutescens* britton leaf extract against the growth, migration, and adhesion of human cancer cells. *Nutr Res Pract* 2015; 9(1): 11-16.
  22. Bundscherer A, Malsy M, Lange R, Hofmann P, Metterlein T, Graf BM, et al. Cell harvesting method influences results of apoptosis analysis by annexin V staining. *Anticancer Res* 2013; 33(8): 3201-3204.
  23. Irons R, Tsuji PA, Carlson BA, Ouyang P, Yoo MH, Xu XM, et al. Deficiency in the 15-kDa selenoprotein inhibits tumorigenicity and metastasis of colon cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(5): 630-639.
  24. National Academy of agricultural Science. Tables of food functional composition. Suwon: Rural Development Administration; 2009.
  25. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44(1): 239-267.
  26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-674.
  27. Weinberg RA. The biology of cancer. New York (NY): Garland Science; 2007.
  28. Kwak Y, Ki S, Noh EK, Shin HN, Han YJ, Lee Y, et al. Comparison of antioxidant and anti-proliferative activities of perilla (*Perilla frutescens* Britton) and sesame (*Sesamum indicum* L.) leaf extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 2013; 29(3): 241-248.
  29. Woo WS. Phenolic compound. In *Natural product chemistry method*. 2nd ed. Seoul: Seoul National University; 1995.
  30. Seo Y, Kim H. Antioxidant activity of fruits of *Ligustrum japonicum*. *Ocean Polar Res* 2017; 39(2): 115-124.
  31. Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, et al. Antioxidant activity of extracts and fractions from *Aster scaber*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012; 41(9): 1197-1204.
  32. Pak WM, Kim KBWR, Kim MJ, Kang BK, Bark SW, Kim BR, et al. Antioxidative effect of extracts from different parts of Kohlrabi. *J Appl Biol Chem* 2014; 57(4): 353-358.
  33. Kim SM, Kim DY, Park HR, Seo JH, Yeom BY, Jin YJ, et al. Screening the antioxidant components and antioxidant activity of extracts derived from five varieties of edible spring flowers. *Korean J Food Sci Technol* 2014; 46(1): 13-18.
  34. Lee JE, Kim JH, Kim MY. Changes in phenolic composition, antioxidant and antidiabetic properties of Jeju Citrus sudachi as influenced by maturity. *J Life Sci* 2015; 25(11): 1311-1318.
  35. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* 2017; 387: 95-105.
  36. Kang SM, Hong JG. Antioxidant activities, production of reactive oxygen species, and cytotoxic properties of fractions from aerial parts of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J Food Sci Technol* 2016; 48(6): 574-581.
  37. Lee MJ, Lee SE, Choi NR, Jo SH, Cho S. Effects of hexane fraction of *Dracocephalum palmatum* Stephan leaf on human-derived prostate cancer cell death. *Korean J Herbol* 2018; 33(4): 69-76.