

## 감잎 추출물이 HepG2 인간 간암 세포의 proteasome 활성화에 미치는 영향

김소영<sup>1</sup> · 윤현근<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>성신여자대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>성신여자대학교 바이오식품공학과

### Effects of persimmon leaf extracts on proteasome activity in HepG2 human liver cancer cells

Soyoung Kim<sup>1</sup> and Hyungeun Yoon<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

<sup>2</sup>Department of Food science and biotechnology, Sungshin Women's University

**Abstract** Proteasome inhibitors can promote apoptosis and cell cycle arrest in cancer cells by inhibition of nuclear factor-kappaB (NF-κB) activation. The purpose of this study was to investigate the effects of persimmon leaf extract (PSE) on proteasome activity in HepG2 human liver cancer cells. PSE treatment inhibited the proteasome activity and NF-κB activation in a dose-dependent manner in HepG2 human liver cancer cells ( $p < 0.05$ ). PSE treatment increased the population of cells in G2/M and sub-G1 phases. The results suggested that PSE is one of the candidate substances that may be developed into a proteasome inhibitor.

**Keywords:** proteasome inhibitor, NF-κB, persimmon leaf extracts, HepG2 cells

## 서 론

차류의 소재로 사용되는 식물잎의 기능성에 대한 연구가 진행되고 있다. 감잎(*Diospyros kaki* Thumb. leaf)은 암세포 성장 억제 및 항암 효과(Moon 등, 1996), 항산화 및 항유전독 효과(Kim 등, 2006), 암세포 독성(Kawase 등, 2003) 등을 갖는다고 보고되었다. 녹차잎(*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze leaf)에는 catechin류, flavonol류 등의 생리활성을 나타내는 다양한 polyphenol 물질이 포함되어 있고(Frei와 Higdon, 2003; Sae-tan 등, 2011; Xu 등, 2015) 항균작용(Chou 등, 1999), 항산화 활성(Ryu와 Park, 1997), 콜레스테롤 저하 활성(Muramatsu 등, 1986), 항암 효과(Lee 등, 2006) 등의 기능성이 있다는 연구 결과가 보고되었다. 솔잎(*Pinus densiflora* Siebold & Zucc. leaf)의 항산화 기능성(Kang 등, 1995), 항돌연변이성(Kong 등, 1995), 항균성(Park과 Lee, 2003), 항암 효과(Chung 등, 2002)에 대한 연구 결과가 보고되었다.

Nuclear factor-kappaB (NF-κB)는 동물세포에 존재하는 전사인자로서 apoptosis, 세포증식, 분화, 면역반응, 염증반응과 관련된 유전자 발현을 조절한다. NF-κB는 세포 주기를 조절하는 cyclin D와 apoptosis 억제 인자인 Bcl-2와 Bcl-xL의 발현을 증가시켜 세포 증식을 촉진하고 apoptosis를 억제한다(Aggarwal, 2004; Bours 등, 2000; Dorai와 Aggarwal, 2004; Pahl, 1999). NF-κB는 IκB-

α와 결합한 불활성화 상태로 세포질에 존재한다. 박테리아, 바이러스, 염증성 cytokine, 성장인자, 자외선, 산화 스트레스 등의 세포 외 자극에 의하여 IκB kinase (IKK)가 IκB-α의 인산화를 유발하고 인산화된 IκB-α는 ubiquitin-proteasome system (UPS)에 의하여 ubiquitin화하고 proteasome에 의하여 분해된다. IκB-α가 제거된 NF-κB는 세포핵으로 이동하여 목표 유전자의 발현을 조절한다(Myung 등, 2001; Yoon과 Liu, 2007).

암세포는 항암 치료에 대한 저항으로 NF-κB를 활성화하여 암세포 생존에 유리한 세포 환경을 만들 수 있다(Manasanch와 Orłowski, 2017). 암세포에서 proteasome 활성을 억제하면 IκB-α의 분해가 저해되어 NF-κB를 불활성화 상태로 유지할 수 있으므로 항암 치료에 대한 암세포의 저항성을 감소시킬 수 있다. Proteasome 활성 억제에 대한 연구가 진행 중이고, proteasome 활성 억제제인 bortezomib, ixazomib, carfilzomib는 미국 FDA에 의하여 다발성 골수종(multiple myeloma)과 맨틀세포 림프종(mantle-cell lymphoma) 치료에 사용할 수 있도록 승인되었다(Manasanch와 Orłowski, 2017). 식물생리활성물질로서 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), apigenin, quercetin, genistein 등의 flavonoid류와 celastrol, withaferin A, pristimerin 등의 triterpenoid류는 proteasome 활성 억제 기능을 나타내었다(De Bettignies와 Coux, 2010).

Proteasome 활성 억제 기능을 보유한 물질은 항암 치료의 효율을 향상시키는 보조 기능을 수행할 가능성이 있다. 차류로 이용되는 감잎의 항암 및 항산화 기능성은 확인되었으나 proteasome 억제 활성 기능성에 대한 연구는 수행되지 않았다. 본 연구의 목적은 감잎 추출물이 HepG2 인간 간암 세포의 proteasome 활성 억제에 미치는 영향을 분석하고 HepG2 세포의 cell cycle, NF-κB 활성화에 미치는 영향을 연구하여 proteasome 활성 억제제로 이용될 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

\*Corresponding author: Hyungeun Yoon, Department of Food science and biotechnology, Sungshin Women's University, Seoul 01133, Republic of Korea

Tel: +82-2-920-7682

E-mail: ywise@sungshin.ac.kr

Received June 18, 2019; revised July 21, 2019;

accepted July 24, 2019

## 재료 및 방법

### 재료

L-Glutamine과 Earle's balanced salts가 포함되어 있는 MEM배지는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)는 Gibco (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA solution, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, acetone은 Daejung (Siheung, Korea)에서 구입하였다. Proteasome specific inhibitor인 MG-132와 proteasome substrate (fluorogenic)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Propidium iodide solution (PI)는 Sony Biotechnology (Champaign, IL, USA)에서 구입하였고, Triton X-100와 ribonuclease A from bovine pancreas (RNase)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. NF- $\kappa$ B p65 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, anti-nucleolin antibody는 Millipore (Frankfurter, Germany)에서 구입하였으며 Anti-mouse IgG (HRP-linked antibody)와 Anti-biotin (HRP-linked antibody)는 Cell Signaling (Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blot detection kit인 ECL solution은 Elpis-biotech (Taejeon, Korea)에서 구입하였고 DC Protein kit I은 BIO-RAD (Hercules, CA, USA)에서 구입하였으며 Immobilon-P transfer membrane은 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), aprotinin bovine, leupeptin hydrochloride, pepstatin A, DL-dithiothreitol (DTT), phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), phosphate buffered saline (PBS)을 포함한 이 외의 시약들은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

### 감잎 추출물 제조

감잎(*Diospyros kaki* Thumb. leaf)은 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 감잎 추출물을 제조하는 방법은 선행 연구를 참고하여 수행하였다(Sun 등, 2002). 감잎 25 g을 미리 냉각한 80% (v/v) acetone 200 mL에 넣고 5분 동안 blender로 갈고 homogenizer (Tops, Daeillab service, Seoul, Korea)로 3분 동안 균질화하였다. 균질화된 감잎액을 Whatman no 2. 여과지(GE healthcare, Pittsburgh, PA, USA)로 여과하여 얻은 여과액을 회전 증발 농축기 (Eyela, Japan)를 이용하여 45°C에서 부피가 처음 여과액의 약 10%가 되도록 농축했다. 농축액을 -80°C에서 24시간 동안 동결한 후 동결건조기(TFD series, Ilshinbiobase, Dongducheon, Korea)로 건조하여 감잎 추출물(persimmon leaf extracts(PSE)) 분말 2 g을 획득하였다. 감잎 추출물은 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

### 세포 배양

인간 유래 간암 세포주인 HepG2 세포(human hepatocarcinoma cell line)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받았다. MEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 세포 배양에 사용하였고 세포는 T-25나 T-75 flask에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### Proteasome 억제 활성(proteasome inhibitory activity (PIA)) 측정

HepG2 세포를 96-well microplate에 8.0×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주하여 배양 배지 100  $\mu$ L에서 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 각 농도의 시험 시료가 용해되어 있는 배양 배지를 세포에 처리하여 1 h 동안 37°C, 5%

CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 FBS와 phenol red가 제거된 배양 배지에 용해되어 있는 100  $\mu$ M proteasome substrate III를 세포에 처리하고 fluorescence microplate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 매 2 min마다 1 h 동안 fluorescence (380 nm excitation, 460 nm emission)를 측정했다. Proteasome specific inhibitor인 MG-132 (10  $\mu$ M)를 표준 proteasome 활성 억제제로 이용하였다. 측정 시간에 따른 fluorescence 곡선 이하 면적을 이용하여 시료의 proteasome 억제 활성(PIA)을 다음과 같이 정량하였다.

$$\text{PIA unit (\%)} = 100 \times (\text{ICA} - \text{ISA}) / (\text{ICA} - \text{MA})$$

CA는 시험 시료를 처리하지 않았을 때 시간에 따른 fluorescence 곡선 이하 면적이고 SA는 시험 시료를 처리했을 때 시간에 따른 fluorescence 곡선 이하 면적이다. MA는 10  $\mu$ M MG-132를 처리했을 때 시간에 따른 fluorescence 곡선 이하 면적이다.

### NF- $\kappa$ B 활성화 측정

감잎 추출물이 NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 영향을 western blotting으로 측정하기 위하여 TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation model을 사용하였다(Yoon과 Liu, 2007). HepG2 세포를 6-well plate에 1×10<sup>6</sup> cells/well (2 wells/treatment)의 농도로 배양 배지 1 mL에 담아 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척하고 Serum-free MEM 배지에 시험 시료를 각 농도로 희석하여 처리하였고 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS로 1회 세척한 후 10 ng/mL의 농도로 희석한 TNF- $\alpha$ 를 넣어 30 min 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시켰다.

세포를 회수하여 세포질 추출물과 핵 추출물을 얻는 과정은 선행 연구를 참고하여 수행하였다(Pozo-Guisado 등, 2005). 세포를 냉각한 PBS로 2회 세척하고 얼음 위에서 scraper를 이용하여 세포를 떼어낸 후 4°C에서 130×g로 5 min 동안 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 cell pellet은 냉각한 hypotonic buffer (10 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.4 mM PMSF, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL pepstatin)와 섞어 현탁액을 만들고 얼음에 15분간 방치한 후 10% IGEPAL을 첨가하여 vortexer로 15 min 동안 강하게 섞었다. 이 현탁액은 4°C에서 12,000×g로 3 min 동안 원심분리하였고 상층액인 세포질 추출물을 모아서 -80°C에 보관하였다. 상층액을 제거하고 남은 핵 pellet에 냉각한 high-salt extraction buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.4 mM PMSF, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL pepstatin)를 넣어 4°C에서 30 min 동안 waving shaker에서 교반시키며 핵막을 분해한 후 4°C, 12,000×g로 30 min 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 상층액은 핵 추출물로서 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다.

핵 추출물은 Bio-Rad의 DC Protein Kit I을 사용하여 단백질 정량을 수행하였고, 단백질 정량 후 시료들의 단백질 양을 동일하게 조절하여 2× sample buffer와 1:1로 섞어 전처리하였다. 전처리 한 시료들을 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel에 전기영동시킨 후 PVDF transfer membrane으로 gel의 단백질을 transfer시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 3% non-fat dry milk in 0.1% (w/v) PBS-Tween 20 (PBST)으로 실온에서 1 h 동안 waving

shaker로 교반하며 blocking한 후 NF-κB p65 (1:250), anti-nucleolin (1:5000)을 넣고 4°C에서 24 h 동안 교반하였다. 이후 0.1% PBST로 5 min 간격으로 3회 세척하였고 anti-mouse IgG (1:1000)와 anti-biotin (1:5000)을 넣고 상온에서 2 h 동안 교반하였다. 0.1% PBST로 membrane을 5 min 간격으로 4회 세척한 후 ECL 용액을 처리하여 nucleolin band를 기준으로 NF-κB band를 상대적으로 정량하였다.

**Cell cycle 분석**

유세포 분석기(SH800, Sony corporation, Japan)를 이용하여 cell cycle을 분석하는 방법은 cell cycle analysis protocol을 참고하여 수행하였다(Darzynkiewicz와 Juan, 2001). HepG2 세포를 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well (2 wells/treatment)의 농도로 배양 배지 1 mL에 담아 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 배지를 버리고 세포를 PBS로 1회 세척하고 serum-free MEM 배지에 0, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 희석하여 필터링한 시험 시료(2 wells/treatment)를 1 mL씩 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 반응시킨 세포를 시험 시료별로 모아 130×g, 4°C에서 4 min 동안 원심분리하여 cell pellet을 얻고 PBS로 2회 세척한 후 70% ethanol로 -20°C에서 2 h 이상 고정시켰다. 고정시킨 세포를 PBS로 1회 세척하고 PBS 0.1 mL에 resuspension시킨 후 0.1% Triton X-100, 200 µg/mL RNase를 넣어 어두운 실온에서 30 min 동안 반응시켰다. 반응 후 0.5 mg/mL PI 용액을 첨가하였고 ice box에서 빛을 차단하여 15 min 동안 반응시킨 후 flow cytometry를 이용하여 488 nm excitation과 610 nm emission에서 cell cycle을 분석하였다.

**통계처리**

실험은 3회 반복 실시하였고 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. SPSS (ver. 22, IBM, Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하여 통계 처리를 실시하였다. 처리군의 결과는 ANOVA를 실시하여 분석하였다. 다중 검정은 측정값 사이의 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 실시하였다. 두 평균의 paired test는 Student's *t*-test를 이용하여 실시하였다 ( $p < 0.05$ ).

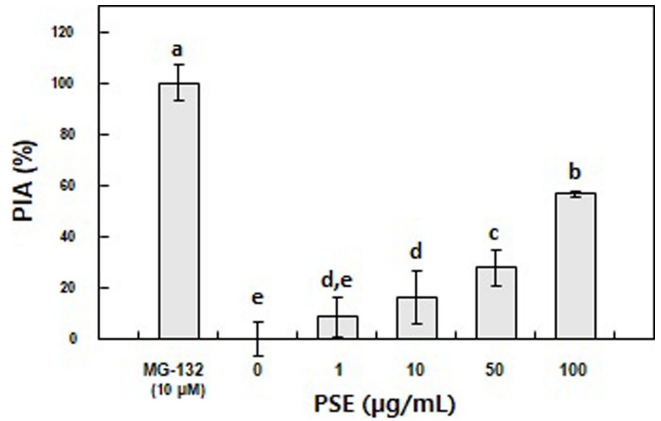
**결과 및 고찰**

**감잎 추출물의 proteasome 억제 활성**

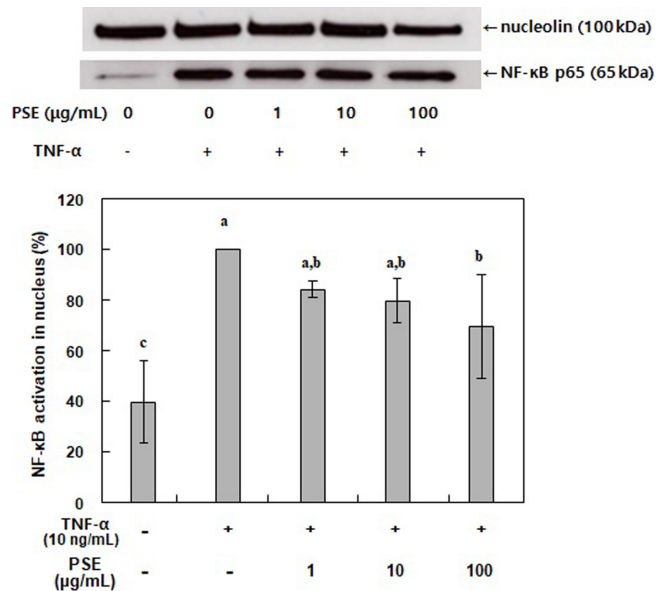
Persimmon leaf extract (PSE)를 1, 10, 50, 100 µg/mL 농도로 HepG2 세포에 1 h 동안 처리하고 proteasome 활성을 측정하였다. 감잎 추출물(PSE)은 시험한 용량에서 proteasome의 활성을 용량 의존적으로 억제하였다(Fig. 1). 100 µg/mL 농도에서 PSE의 proteasome 억제 활성(proteasome inhibitory activity, PIA)은 MG-132의 PIA (100%)를 기준으로  $56.5 \pm 1.4\%$ 이다.

**감잎 추출물이 NF-κB 활성화에 미치는 영향**

PSE를 1, 10, 100 µg/mL 농도로 HepG2 세포에 24 h 동안 처리하고 10 ng/mL TNF-α에 의하여 NF-κB가 세포핵 안으로 이동하도록 유도하는 모델을 이용하여 PSE가 NF-κB 활성화에 미치는 영향을 western blotting으로 정량하였다. PSE는 100 µg/mL 농도에서 HepG2 세포의 NF-κB 활성화를 유의하게 억제하였다 ( $p < 0.05$ )(Fig. 2). PSE는 용량 의존적으로 HepG2 세포의 NF-κB 활성화를 억제하는 경향을 보였으나 1과 10 µg/mL 농도에서는 유의한 결과를 나타내지 않았다.



**Fig. 1. Proteasome inhibitory activities (PIA) of PSE.** HepG2 cells were treated with PSE for 1 h. PSE denotes persimmon leaf extracts. Bars with different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

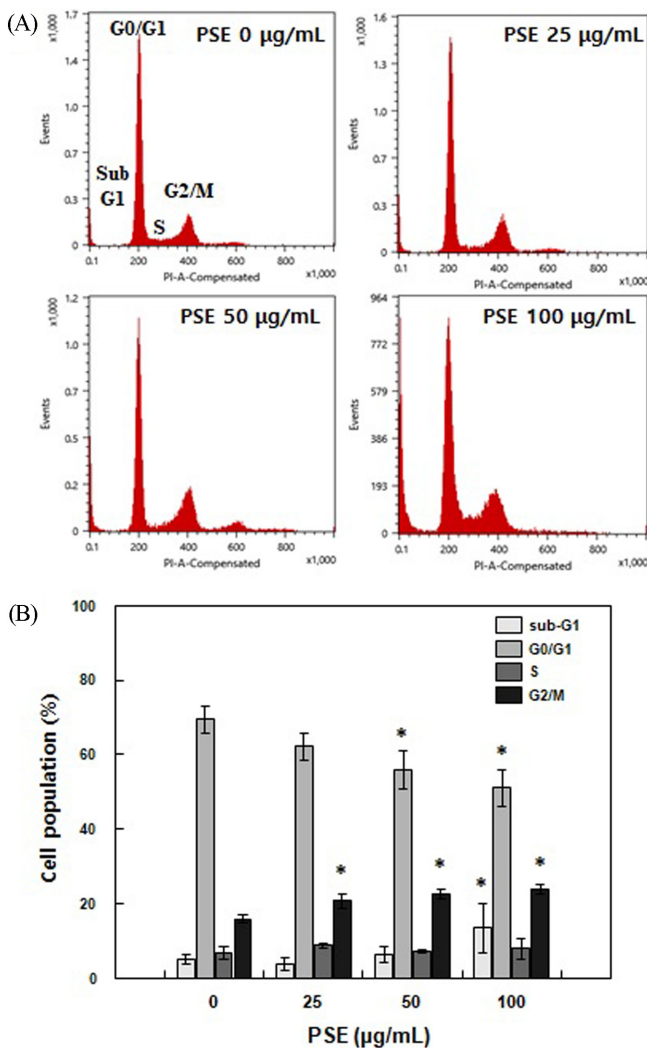


**Fig. 2. Effects of PSE on TNF-α-induced NF-κB activation.** HepG2 cells were treated with PSE for 24 h and NF-κB activation was induced with 10 ng/mL TNF-α. NF-κB p65 bands were quantified while nucleolins were used as loading controls. PSE denotes persimmon leaf extracts. Bars with different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

**감잎 추출물이 HepG2 세포의 cell cycle에 미치는 영향**

PSE를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 HepG2 세포에 24 h 동안 처리하고 flow cytometry를 이용하여 cell cycle을 분석하였다. PSE를 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 negative control (0 µg/mL)과 비교하여 sub-G1기가 유의하게 증가하였고 50, 100 µg/mL 농도로 처리했을 때 G0/G1기가 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 3). S기는 PSE 용량에 따른 유의한 차이를 나타내지 않았으며 PSE 25, 50, 100 µg/mL 농도에서 G2/M기가 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). PSE는 시험한 용량으로 G2/M기에서 cell cycle arrest를 유발하였고 sub-G1기를 유의하게 증가시켰다.

감잎은 아미노산, 당류, 탄닌, 비타민 A, carotenoids, flavonoids 및 triterpenoids 등을 함유하고 있다(Duan 등, 2004; Funayama와 Hikino, 1979; Thuong 등, 2008). 본 연구에서 PSE는 시험한 용



**Fig. 3. Flow cytometric DNA content analysis of HepG2 cells treated with PSE.** HepG2 cells were treated with PSE for 24 h. (A) Flow cytometry. (B) Cell population analysis. PSE denotes persimmon leaf extracts. An asterisk (\*) indicates significant differences compared with the negative control ( $p < 0.05$ ).

량 범위 안에서 HepG2 세포의 proteasome 억제 활성을 나타내었고 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하였다. PSE가 proteasome 억제 활성을 통하여 NF- $\kappa$ B의 활성화를 일부 억제하였다고 설명할 수 있다. PSE에 의하여 HepG2 세포의 G2/M기와 sub-G1기가 유의하게 증가한 것은 cell cycle arrest와 apoptosis가 유발된 것으로 해석할 수 있고 이러한 현상의 일부는 NF- $\kappa$ B 활성화 억제에 기인한다고 유추할 수 있다.

본 연구에서 PSE의 proteasome 억제 활성을 확인하였고 이러한 결과는 PSE에 포함된 식물생리활성물질 중에 proteasome 활성 억제제로 이용할 수 있는 물질이 존재할 가능성을 제시한다. 추후에 PSE로부터 proteasome 억제 활성을 보유한 물질을 분리하여 동정하는 연구가 필요하다.

## 요 약

Persimmon leaf extract (PSE) 는 HepG2 인간 간암 세포에서 proteasome의 활성과 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하였고 cell cycle에서

G2/M기와 sub-G1기의 cell population을 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과는 PSE의 식물생리활성물질을 proteasome 활성 억제제로 개발할 수 있는 가능성을 제시한다.

## 감사의 글

이 성과는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(2017R1A2B4012333).

## References

- Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B: The enemy within. *Cancer Cell*. 6: 203-208 (2004)
- Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. Nuclear factor- $\kappa$ B, cancer, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1085-1089 (2000)
- Chou CC, Lin LL, Chung KT. Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 125-130 (1999)
- Chung YJ, Bae MW, Chung MI, Lee JS, Chung KS. Cytotoxic effect of the distilled pine-needle extracts on several cancer cell lines *in vitro*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 691-695 (2002)
- Darzynkiewicz Z, Juan G. DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis. *Current protocols in cytometry*. Chapter 7 (2001)
- De Bettignies G, Coux O. Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie*. 92: 1530-1545 (2010)
- Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* 215: 129-140 (2004)
- Duan J, Zheng Y, Dong Q, Fang J. Structural analysis of a pectic polysaccharide from the leaves of *Diospyros kaki*. *Phytochemistry*. 65: 609-615 (2004)
- Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *J. Nutr.* 133: 3275s-3284s (2003)
- Funayama S, Hikino H. Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 2865-2868 (1979)
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 978-984 (1995)
- Kawase M, Motohashi N, Satoh K, Sakagami H, Nakashima H, Tani S, Shirataki Y, Kurihara T, Spengler G, Wolfard K, Molnar J. Biological activity of persimmon (*Diospyros kaki*) peel extracts. *Phytother. Res.* 17: 495-500 (2003)
- Kim SY, Jeong SM, Kim SJ, Jeon KI, Park E, Park HR, Lee SC. Effect of heat treatment on the antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) peel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 999-1002 (2006)
- Kong Z, Liu Z, Ding B. Study on the antimutagenic effect of pine needle extract. *Mutat. Res.* 347: 101-104 (1995)
- Lee AH, Fraser ML, Meng X, Binns CW. Protective effects of green tea against prostate cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6: 507-513 (2006)
- Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14: 417-433 (2017)
- Moon SH, Kim KH, Park KY. Antitumor effect of persimmon leaves *in vivo* using sarcoma-180 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 865-870 (1996)
- Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32: 613-622 (1986)
- Myung J, Kim KB, Crews CM. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21: 245-273 (2001)
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene*. 18: 6853-6866 (1999)
- Park KN, Lee SH. Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of vibrio. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 185-190 (2003)
- Pozo-Guisado E, Merino JM, Mulero-Navarro S, Lorenzo-Benayas MJ, Centeno F, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM.

- Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int. J. Cancer.* 115: 74-84 (2005)
- Ryu BH, Park CO. Antioxidant effect of green tea extracts on enzymatic activities of hairless mice skin induced by ultraviolet B light. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 355-361 (1997)
- Sae-tan S, Grove KA, Lambert JD. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacol. Res.* 64: 146-154 (2011)
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agr. Food Chem.* 50: 7449-7454 (2002)
- Thuong PT, Lee CH, Dao TT, Nguyen PH, Kim WG, Lee SJ, Oh WK. Triterpenoids from the leaves of *Diospyros kaki* (persimmon) and their inhibitory effects on protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Nat. Prod.* 71: 1775-1778 (2008)
- Yoon H, Liu RH. Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF-kappaB activation in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Agr. Food Chem.* 55: 3167-3173 (2007)
- Xu Y, Zhang M, Wu T, Dai S, Xu J, Zhou Z. The anti-obesity effect of green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high-fat diet. *Food Funct.* 6: 296-303 (2015)