

연구노트

식물생리활성물질과 과일류 추출물이 MCF-7 유방암 세포에서 H₂O₂로 유도된 Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) 활성도에 미치는 영향

윤 현 근^{1,*}

¹성신여자대학교 바이오식품공학과

Effects of selected phytochemicals and fruit extracts on Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity induced by H₂O₂ in MCF-7 breast cancer cells

Hyungeun Yoon^{1,*}

¹Department of Food science and biotechnology, Sungshin Women's University

Abstract Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is a nuclear enzyme which is activated in response to DNA damage, and which mediates DNA repair. PARP inhibitors can be used to reduce resistance of cancer cells to anticancer treatments. The objective of this study was to investigate the effects of selected phytochemicals and fruit extracts on PARP activation in MCF-7 breast cancer cells subjected to oxidative stress. Pre-incubation with epigallocatechin gallate (EGCG), apple extract (AE), cranberry extract (CE), or grape extract (GE) for 2 hours at test concentrations reduced PARP activity induced upon treatment with hydrogen peroxide in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). GE was found to be the most efficient PARP inhibitor among the fruit extracts examined. These results suggest that phytochemicals of fruit extracts might be used as PARP inhibitors in order to assist anticancer agents.

Keywords: PARP inhibitor, phytochemical, EGCG, fruit extract

서 론

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)는 세포핵 안에 존재하는 효소로서 활성산소, ionizing radiation 등에 의하여 DNA가 손상 되었을 때 이를 복구하는 과정에 관여한다(Keung 등, 2019). PARP family는 18종류의 단백질로 구성되어 있고 C 말단의 활성 부위인 PARP-1v 도메인을 공유하고 있다(Ame 등, 2004). PARP-1은 113 kD 크기의 단백질로서 한 세포 안에 103~106개의 분자가 존재한다(Bouchard 등, 2003).

DNA 손상이 발생하면 PARP-1은 활성화되어 N 말단의 zinc finger 구조를 이용하여 손상된 DNA와 결합하고 NAD⁺를 ADP-ribose와 nicotinamide로 분해하면서 poly(ADP-ribose)를 합성한다(Hong 등, 2004; Ikejima 등, 1990). PARP-1에 의하여 ADP-ribose는 PARP-1 자신이나 histone, DNA polymerase, topoisomerase, DNA ligase-2 등의 단백질과 결합하게 되고 poly(ADP-ribose)와 결합한 단백질은 활성화된다(Hong 등, 2004; Nicoletti와 Stella, 2003). PARP-1의 작용으로 세포 내의 NAD⁺ 양은 감소하여 NAD/NADH 비율이 변화하고 이에 따라 glycolysis, pentose shunt, Krebs cycle에 관련된 효소가 활성화된다. DNA 손상 정도가 심하지 않을 때 PARP-1은 cell cycle arrest를 유발하고 DNA

복구와 관련된 인자를 활성화하지만, DNA 손상이 심할 때는 apoptosis inducing factor (AIF)가 미토콘드리아로부터 핵으로 이동하는 것을 촉진하여 apoptosis를 유발한다(Bouchard 등, 2003). PARP-1이 과도하게 활성화되면 세포 안의 NAD⁺가 고갈되고 세포는 NAD⁺의 양을 회복하기 위하여 nicotinamide와 ATP를 소모하므로 세포의 ATP 양이 감소한다.

암질병의 치료 과정에서 암세포의 DNA 손상을 유발하여 암세포 성장을 억제하고자 할 때 치료에 대한 암세포의 저항으로 PARP가 활성화되면 DNA 손상 복구가 원활하게 이루어져 암세포의 생장이 저해되지 않는다. PARP 활성억제제는 PARP가 DNA 손상 복구 인자를 손상 부위에 유인하는 작용을 억제하고 PARP를 DNA 손상 부위에 고착시켜 PARP 활성을 저해한다(Matulonis, 2017). PARP 활성억제제는 암세포의 DNA 손상 복구를 억제하고 암세포의 사멸을 유도할 수 있다. 암세포는 항암 치료 단계에서 PARP를 활성화하여 항암 치료를 무력화하는 기전을 가지고 있으므로 PARP 활성억제제는 항암 치료의 효율을 높이는 기능을 한다. 활성억제제로서 Olaparib, Rucaparib, Niraparib, talazoparib 등은 미국 FDA에 의하여 항암제로 승인되어 난소암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 난관암, 복막암 등의 치료에 이용된다(Matulonis, 2017).

사과, 크랜베리, 포도 등의 과일 추출물과 그 식물생리활성물질들은 다양한 기전을 통하여 항암성 등 건강을 증진시키는 가능성을 보유하고 있다고 알려져 있다(Tu 등, 2017; Pérez-López 등, 2009; Nassiri-Asl과 Hosseinzadeh, 2016). 식물생리활성물질의 항암 기능성에 관한 연구는 여러 방면에서 이루어지고 있으나 PARP 활성 억제 기능성에 관한 연구는 더 필요한 상황이다.

본 연구에서는 MCF-7 인간 유방암 세포 모델을 이용하여 식

*Corresponding author: Hyungeun Yoon, Department of Food science and biotechnology, Sungshin Women's University, Dobong-ro 76ga-gil 55, Gangbuk-gu, Seoul 01133, Republic of Korea
Tel: +82-2-920-7682

E-mail: ywise@sungshin.ac.kr

Received June 11, 2019; revised August 16, 2019;

accepted August 16, 2019

품 형태로 섭취할 수 있는 식물생리활성물질과 과일류 추출물의 PARP 활성억제능력을 측정하여 분석하고 PARP 활성억제제로의 개발 가능성을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

재료

Epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), catechin, quercetin dehydrate, resveratrol, α -tocopherol, L-ascorbic acid, 2,2'-AZINO-bis[3-ethylbenziazoline-6-sulfonic acid] (ABTS), streptavidin-peroxidase polymer, acetone은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Biotinylated NAD⁺는 Trevigen Inc. (Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하였고 α -tocopherol은 MP Biomedicals Co.(Irvine, CA, USA)에서 구입하였다. 이외의 다른 시약은 Merck에서 구매하였다.

과일류 추출물 제조

사과(*Malus pumila*), 크랜베리(*Vaccinium macrocarpon*), 포도(*Vitis labrusca*)는 식료품점에서 구매하였고 용매 추출방법을 응용하여 과일류의 추출물을 제조하였다(Wolfe 등, 2003). 껍질을 포함한 각 과일류 25 g을 80% (v/v) acetone 200 mL에 넣고 5분 동안 믹서기에서 분쇄하고 homogenizer로 3분 간 균질화하였다. 균질화된 과일류액을 여과지(Whatman no. 2, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)로 여과하여 여과박을 제거하고 여과액을 45°C 조건에서 회전 증발 농축기를 이용하여 부피가 처음 여과액의 약 10%가 될 때까지 농축하였다. 농축된 과일류 여과액을 -80°C에서 동결한 후 동결건조기를 이용하여 건조해서 사과 추출물(apple extracts (AE)) 1.9 g, 크랜베리 추출물(cranberry extracts (CE)) 2.1 g, 포도 추출물(grape extracts (GE)) 1.7 g을 제조하였다.

세포배양

MCF-7 인간 유방암 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하였고 Minimum Essential Medium Alpha (MEM α) 배지(10% fetal bovine serum, 0.01 mg/mL insulin, 10 mM HEPES (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 포함)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

PARP 활성 측정

PARP 활성 측정은 기존의 방법을 변형하여 실시하였다(Bakondi 등, 2002). MCF-7 세포를 6×10⁴ cells/well 농도로 96-well microplate에 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배지를 제거하고 시료가 농도별로 용해된 배지로 세포를 2시간 동안 추가 배양한 뒤 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세포를 세척하였다. 식물생리활성물질들은 각각 12.5, 25, 50, 100 μ M 농도를 시험하였고 과일류 추출물은 각각 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μ g/mL 농도를 시험하였다. 세포를 hydrogen peroxide 500 μ M 농도로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30분 간 처리하고 PARP reaction buffer (56 mM HEPES, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% digitonin, 5 mM biotinylated NAD⁺)로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 60분 동안 배양하였다. PARP reaction buffer를 제거한 후 냉각시킨 95% 에탄올(200 mL/well)로 세포를 -20°C에서 10분 간 처리하여 고정하였다. PBS로 세포를 세척한 후 1% bovine serum albumin (BSA) 용액으로 30분 동안 37°C에서 추가 배양 후에 streptavidin-peroxidase polymer (1:40000 희석, 50 μ L/

well) 용액으로 30분 간 더 처리하였다. 이후 세포에 ABTS 용액 (2.5 mM, 100 μ L/well)을 처리하고 2시간 후에 420 nm에서 흡광도를 측정하였다(MRX II Dynex plate reader, Dynex Technologies, Inc., Chantilly, VA, USA). 시험 시료를 첨가하지 않은 실험군을 대조군으로 하여 시료의 PARP 활성 억제능을 비교하였다.

통계처리

실험은 3회 반복 실시하였고 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계처리는 SPSS (ver. 22, IBM, Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하여 실시하였다. 처리군의 결과는 ANOVA를 실시하여 분석하였고 다중범위 검정은 측정값 사이의 유의성을 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

MCF-7 세포를 EGCG 12.5, 25, 50, 100 μ M 농도로 2시간 동안 처리한 결과 hydrogen peroxide에 의해 유발되는 PARP 활성이 EGCG 용량 의존적으로 억제되었다(Fig. 1). ECG, EGC, EC, catechin, quercetin dehydrate, resveratrol, α -tocopherol, L-ascorbic acid는 시험한 용량 범위 안에서 PARP 활성 변화에 유의미한 영향을 미치지 않았다. PARP 활성을 10%로 감소시키는데 필요한 시료의 용량을 A₁₀이라고 정의하고 PARP 활성 로그값 변화 기울기의 음 역수를 A₁₀ 값으로 하면 EGCG의 A₁₀은 460.9±161.1 μ M이다.

사과 추출물(AE), 크랜베리 추출물(CE), 포도 추출물(GE)은 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μ g/mL 농도에서 각각 MCF-7 세포의 PARP 활성을 용량 의존적으로 저해하였다(Fig. 2). AE, CE, GE의 A₁₀은 각각 20.8±1.4, 8.8±0.2, 4.5±0.2 μ g/mL이고 상호 간에 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$). 본 연구에서 시험한 식물생리활성물질 중에서 EGCG를 제외한 시료들은 단독으로 작용했을 때 PARP 활성에 유의한 변화를 유발하지 못하였으나 AE, CE, GE는 여러 종류의 식물생리활성물질들이 복합적으로 작용하여 각각의 과일류 추출물이 PARP 활성 억제 기능을 나타내었다. 본 연구에서 A₁₀ 값을 기준으로 과일류 추출물 중에서 GE가 가장 우수한 PARP 활성 억제능을 나타내었다. 포도에는 식물활성물질로서 oleanolic acid, betulinic acid, daucosterol, resveratrol, viniferin, catechin, gallic acid 등이 포함되어 있고 이 중 resvera-

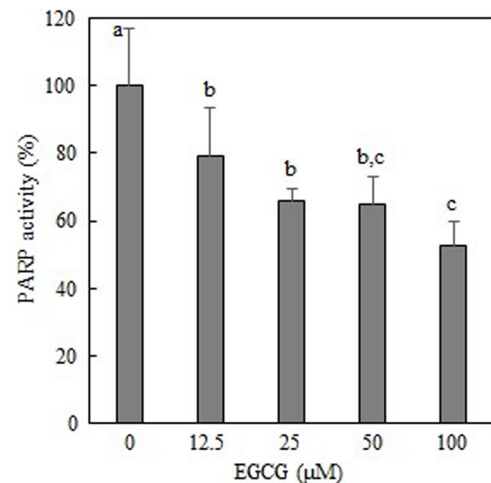


Fig. 1. Effects of EGCG on PARP activity. Bars with different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

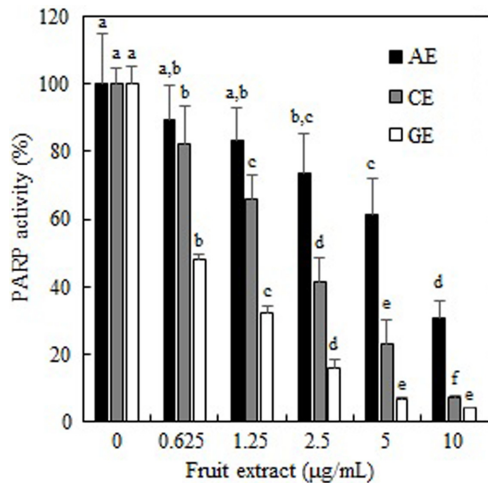


Fig. 2. Effects of fruits extracts on PARP activity. AE denotes apple extracts, CE denotes cranberry extracts, and GE denotes grape extracts. Bars of the same fruit extracts with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

rol이 대표적인 건강 기능성 물질이다(Nassiri-Asl과 Hosseinzadeh, 2016).

세포는 DNA 손상을 입었을 때 손상을 일으킨 자극원의 강도에 따라 반응하는 경로가 다르다. 낮은 수준의 DNA 손상이 일어났을 때 PARP-1이 X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1), DNA dependent protein kinase (DNA-PK) 등의 DNA repair enzyme과 상호 작용하여 DNA repair 과정을 유도한다(Jagtap과 Szabo, 2005). DNA 손상이 과중하여 원래 상태로 회복 불가능한 경우에 세포는 apoptosis나 necrosis 과정을 통하여 사멸한다. 세포의 necrosis 과정에서 PARP는 과도하게 활성화되어 NAD⁺와 ATP를 고갈시킨다. 낮은 수준의 DNA 손상이 일어났을 때 PARP는 활성화되어 자기 자신의 표면에도 poly(ADP-ribose) polymers를 부착시키고 이로 인하여 PARP 활성이 억제된다. 한편, poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)는 PARP 표면에 부착된 poly(ADP-ribose) polymers를 제거하여 PARP 활성이 회복되도록 하므로 PARG 활성 억제는 PARP 활성 억제 효과를 나타낸다(Bakondi 등, 2004). 탄닌(tannin) 유도체는 PARG 활성 억제제로 알려져 있다.

DNA 손상을 유발하는 항암 약제에 대응하여 암세포에서는 PARP에 의한 DNA 복구가 활성화되어 항암 약제의 효능이 낮아지게 되므로 PARP 활성억제제는 항암 약제의 효능을 보조하는 기능이 있다. Benzamide와 isoquinolinone 등의 PARP 활성억제제는 inflammatory disease를 치료하는 과정에서 세포가 necrosis를 일으키지 않고 apoptosis를 통하여 사멸하도록 하는 역할을 한다(Cosi, 2002). 또한, PJ34와 INO-1001 등의 PARP 활성억제제는 심혈관 질환과 고혈압과 연관된 내피세포 기능 장애의 위험도를 낮출 수 있는 것으로 알려져 있다(Szabo 등, 2004).

본 연구에서 식품 성분인 EGCG와 식품으로 소비하는 과일류의 추출물(AE, CE, GE)이 hydrogen peroxide에 의하여 유발된 PARP 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 시료의 항산화 기능성에 의하여 hydrogen peroxide의 산화력이 상쇄되어 PARP 활성화가 감소하여 유발되었을 가능성과 시료가 PARP나 PARG의 활성을 직접적으로 저해한 결과일 가능성이 있다. α -Tocopherol과 L-ascorbic acid를 비롯한 항산화 기능성이 우수한 시료가 hydrogen peroxide에 의한 PARP 활성화에 영향을 미치지

못하였다는 결과는 EGCG가 PARP 역가를 저해하는 과정에서 hydrogen peroxide의 산화력 억제를 통한 DNA 손상 방지로 PARP 활성화를 억제한 것이 아니라 PARP에 직접 작용하여 PARP의 역가를 저해했을 가능성을 보여준다. 앞으로 AE, CE, GE에서 PARP 활성 억제능을 보이는 활성 물질을 분리하고 EGCG 및 과일류 추출물의 PARP 활성 억제 기전을 구명하는 연구가 필요하다.

요약

사과 추출물(AE), 크랜베리 추출물(CE), 포도 추출물(CE), EGCG는 hydrogen peroxide에 의하여 유발된 MCF-7 인간 유방암 세포의 PARP 활성을 유의하게 억제하였다. GE는 본 연구에서 다른 과일류 추출물보다 우수한 PARP 활성 억제능을 나타내었다. 식품 성분으로서 안전성을 갖춘 우수한 PARP 활성 억제 소재를 발굴하여 PARP 활성 억제 기전을 구명하고 PARP 활성 억제제 효능 향상을 방안을 제시하는 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구를 실행하는데 도움을 준 Cornell University의 Rui Hai Liu 교수에게 감사의 뜻을 전합니다.

References

Ame J, Spenlehauer C, De Murcia G. The PARP superfamily. *BioEssays* 26:882-893 (2004)

Bakondi E, Bai P, Erdelyi K, Szabo C, Gergely P, Virag L. Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Dermatol.* 13:170-178 (2004)

Bakondi E, Bai P, Szabo E, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, et al. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J. Histochem. Cytochem.* 50:91-98 (2002)

Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* 31:446-454 (2003)

Cosi C. New inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase and their potential therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Pat.* 12:1047-1071 (2002)

Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:259-264 (2004)

Ikejima M, Noguchi S, Yamashita R, Ogura T, Sugimura T, Gill D, et al. The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 265:21907-21913 (1990)

Jagtap P, Szabo C. Poly(ADP-ribose)polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:421-440 (2005)

Keung MY, Wu Y, Vadgama JV. PARP inhibitors as a therapeutic agents for homologous recombination deficiency in breast cancers. *J. Clin. Med.* 8:435 (2019)

Matulonis UA. PARP inhibitors in BRCA-related ovarian cancer-and beyond! [cited 2019 June 4]. Available from: <https://www.asco-post.com/issues/november-25-2017/parp-inhibitors-in-brca-related-ovarian-cancer-and-beyond/> (2017)

Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytother. Res.* 30:1392-1403 (2016)

Nicoletti VG, Stella AMG. Role of PARP under stress conditions: cell death or protection? *Neurochem. Res.* 28:187-194 (2003)

Pérez-López F, Haya J, Chedraui P. *Vaccinium macrocarpon*: An

- interesting option for women with recurrent urinary tract infections and other health benefits. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 35:630-639 (2009)
- Szabo C, Pacher P, Zsengeller Z, Vaslin A, Komjati K, Benko R, et al. Angiotensin II-mediated endothelial dysfunction: Role of poly(ADP-ribose)polymerase activation. *Mol. Med.* 10:28-35 (2004)
- Tu S, Chen L, Ho Y. An apple a day to prevent cancer formation: reducing cancer risk with flavonoids. *J. Food Drug Anal.* 25:119-124 (2017)
- Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant Activity of Apple Peels. *J. Agr. Food Chem.* 51:609-614 (2003)