

Inhibitory Effects of *Prunus mume* Solvent Fractions on Human Colon Cancer Cells

Jeong-Ho Kim¹, Hyun-Dong Cho², Yeong-Seon Won³, Ji-An Heo³, Ji-Young Kim³, Hwi-Gon Kim³, Sim-Hee Han⁴, Kwang-Deog Moon¹ and Kwon-Il Seo^{3*}

¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Industry-Academy Cooperation, Dong-A University, Busan 49315, Korea

³Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

⁴Department of Forest Genetic Bio-resources, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

Received October 7, 2019 / Revised October 22, 2019 / Accepted October 29, 2019

Prunus mume, also known as maesil, is a popular fruit consumed in East Asia (Korea, Japan, and China). It contains high amounts of organic acids, minerals, and polyphenols and has been used as a medication for fever, vomiting, and detoxification. In this study, the anti-proliferative and apoptotic effects of solvent fractions from maesil were evaluated using sulforhodamine B (SRB) assays, morphological evaluations, Hoechst 33258 staining, and western blotting. Addition of the maesil methanol fraction (MMF) and the maesil butanol fraction (MBF) significantly and dose-dependently decreased the cell viability of HT-29 human colon cancer cells. Colony-forming assays confirmed that the MMF and MBF treatments decreased colony numbers when compared with untreated control cells. Treatment of HT-29 cells with MMF and MBF caused a distortion of the cell morphology to a shrunken cell mass. Treatment with MMF and MBF also dose-dependently increased nuclear condensation and the formation of apoptotic bodies in HT-29 cells. Treatment with MMF and MBF significantly and dose-dependently increased the expression of Bax (a pro-apoptotic protein), caspase-3, and poly ADP-ribose polymerase (PARP) and decreased the expression of Bcl-2 (an anti-apoptotic protein). MMF significantly and dose-dependently inhibited cell proliferation induced by bisphenol A, an environmental hormone. Therefore, MMF may have potential use as a functional food and as a possible therapeutic agent for the prevention of colon cancer.

Key words : Apoptosis, colon cancer, environmental hormone, *Prunus mume*, solvent fraction

서 론

최근 서구화된 식생활, 고령 인구의 증가 및 환경적 스트레스 등으로 암의 발생이 증가하고 있다[17]. 암에 의한 사망률은 전 세계적으로 매년 증가하는 경향을 나타내며, 가장 높은 사망원인을 차지하는 질환으로 알려져 있다[18]. 2019년 국내 발생률과 사망률이 전체 암 중 각각 3순위로 보고된 대장암(colorectal cancer; colon cancer)은 대장의 점막에서 생성되는 선암이 대부분이며 결장과 직장에 발생하는 악성종양이다[13, 14]. 근래에는 기술이 발전하여 근치적 절제율이 약 80%에 달하고 있으나 미세 전이병소가 후에 서서히 성장하여 뒤늦게 발견되면 치료가 어렵게 되기 때문에 암 전이의 억제 및 전이병소의 치료는

종양 관련 연구에 있어 궁극적인 목표로 여겨진다[30].

이러한 대장암의 치료 방법으로는 절제술, 냉동수술, 화학요법, 방사선요법 및 표적요법 등이 이용되고 있으나, 면역기능저하, 탈모 및 체중 감소 등의 부작용 등으로 인하여 치료가 제한적으로 이루어져 암 예방을 위한 관리에 관심이 높아지고 있다[1, 3]. 천연물 유래 소재는 합성화학물과는 대조적으로 독성을 거의 나타내지 않기 때문에 안전성 측면에서 뛰어난 장점을 가지며 효과적으로 암을 예방할 수 있는 소재이다[4]. 이에 따라 안전성이 높고 항암 효과가 뛰어난 천연 자원을 이용한 소재의 항암 연구가 요구됨에 따라 천연 자원 소재를 이용한 기능성 식품 및 의약품의 개발이 지속적으로 이루어져야 할 필요가 있다.

Apoptosis는 살아있는 세포의 생존과 사멸의 균형을 조절하여 항상성을 유지하는 세포자가사멸 또는 프로그램된 세포 죽음이라 하며, 미토콘드리아 내 변화를 유도하는 내부적 경로 및 세포막에 존재하는 death receptor에 ligand가 결합하여 유도되는 외부적 경로를 통하여 발생한다[10]. 세포가 정상적인 상태 혹은 병리학적인 요인에 노출된 경우 체계적인 신호전달을 통하여 사멸하게 되는 세포의 방어기전이므로, apoptosis가 제대로 작동하지 않을 경우 정상세포의 암세포화가 진행

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7565, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : kseo@dau.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.

될 수 있거나 촉진될 때에는 퇴행성 질환을 일으킬 수도 있다 [9, 17]. 암세포의 경우 미토콘드리아 내부에서 종양 억제 유전자인 p53에 의하여 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현이 증가하고, pro-apoptotic protein인 Bax의 발현 감소 및 mutation을 통한 apoptosis의 방해를 일으키는 과정을 통해 성장을 지속하기에 항암 연구를 위해서는 apoptosis를 유도하는 기전을 연구하는 것이 필요하다[5]. 이러한 apoptosis가 발생하는 과정에서 세포 형태의 변화로는 세포의 수축, 핵 응축, apoptotic body 형성 및 DNA 분절 등의 특징을 나타내며 진행이 된다[26]. 생화학적 변화로는 세포 독성이나 스트레스 등으로 인한 미토콘드리아의 막 전위 변화로 인하여 cytochrome c가 cytosol로 방출되어 caspase-9 및 apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)과 결합한 후 최종적으로 caspase-3의 활성을 일으켜 apoptosis가 발생하게 된다. Caspase는 protease의 하나로서 정상세포에서는 활성을 띄지 않으며 apoptosis 관련 신호 전달을 받게 되면 세포 내 poly ADP-ribose polymerase (PARP) 등의 표적 단백질을 분해한다[20].

매실(*Prunus mume* Sieb. Et Zucc)은 장미과에 속하는 매화 나무의 과실로서 주로 동아시아에서 재배가 이루어지고 있다 [21]. 예로부터 매실을 이용하여 매실 장아찌 및 매실청 등의 형태로 섭취하여 왔으며 한의학적으로는 본초강목, 명의별록 등에 구충, 해독, 설사, 혈뇨 등을 치료하는 약재로도 사용되어 왔다[12]. 매실의 주요 성분으로는 구연산, 사과산 및 숙신산 등의 유기산이 풍부한 것으로 알려져 있으며, 폴리페놀 및 플라보노이드 성분을 다량 함유하고 있어 영양학적 품질이 뛰어난 과실이다[15, 23]. 매실의 생리활성에 대한 기존의 연구로는 매실 착즙액의 항균 작용[21], 매실 추출물의 섭취에 따른 에너지 기질 및 피로물질의 변화에 미치는 영향[25], 매실 추출물을 함유한 음료의 암세포 성장 억제 효과[2], 매실 추출물의 활성 산소종 소거효과 및 멜라닌 생성 억제 등이 보고된 바 있다 [27]. 그러나 매실을 이용한 대부분의 연구는 추출물 상태로 이루어져 있기에 보다 세부적인 분획물을 이용한 생리활성 비교 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 매실 에탄올추출물을 이용하여 제조한 분획물의 fraction별 대장암세포의 성장억제에 미치는 영향과 이의 apoptosis 유도 효과를 확인하였으며 이를 이용하여 매실 분획물을 이용한 기능성식품 소재화에 대한 가능성을 제시하는 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

매실 추출물 및 분획물의 제조

매실 추출물의 제조를 위한 매실은 순천엔매실(주)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 먼저 매실을 세척한 후 표면의 수분을 제거하고 씨를 분리한 후 믹서기를 이용하여 파쇄하였다. 매실 파쇄액은 EtOH과 1:1(w/v)로 혼합하여 24시간 실온에서

추출한 후 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 Büchner funnel에 Whatman filter paper를 이용하여 감압여과하였다. 수득된 여액은 감압농축 및 동결 건조를 실시하여 계통 분획에 사용하였다.

매실 분획물은 매실 추출물을 dichloromethane (DCM) 및 물을 이용하여 1:10:10(w/v/v)의 비율로 현탁 후 분리된 DCM fraction을 농축하고 여기에 hexane (Hex)과 methanol (MeOH)을 1:10:10(w/v/v)로 분획을 실시하였다. 물 fraction의 경우 동량의 ethyl acetate (EtOAc)와 butanol (BuOH)을 이용하여 순서대로 분획을 실시하여 얻은 각각의 fraction은 maesil hexane fraction (MHF), maesil methanol fraction (MMF), maesil ethyl acetate fraction (MEF), maesil butanol fraction (MBF) 및 maesil aqueous fraction (MAF)로 표기하여 감압여과 및 동결건조 후 dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 증류수로 녹여서 실험에 사용하였다.

인체 대장암세포 배양

본 실험에서 사용한 인체 대장암세포주 HT-29 및 SW480은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, KCLB)으로부터 분양 받아 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic (GIBCO®/Invitrogen™, Grand Island, NY, USA)와 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO®/Invitrogen™)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, MD, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대배양하여 실험에 사용하였다.

Sulforhodamine B (SRB) assay

매실 분획물의 인체 대장암세포주의 증식 억제 효과는 Vichai & Kirtikara [33]의 방법을 이용하여 알아보았다. 세포를 3×10^4 cells/ml가 되도록 희석한 후 48 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 매실 분획물 및 bisphenol A를 DMEM에 농도별로 희석하여 첨가한 후 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 12% TCA를 넣고 4°C에서 부착된 세포를 고정시켜 각 well을 세척한 후 0.4% SRB solution을 첨가하여 암실에서 염색하였다. 1% acetic acid를 이용하여 염색이 끝난 well을 세척하고 10 mM Tris buffer를 이용하여 세포내 염색된 SRB를 녹여낸 후 상등액을 96 well plate에 옮겨 microplate reader (Multiskan Plus, Labsystems, Espoo, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 Control 군의 값을 기준으로 백분율로 표시하였다.

Clonogenic assay

매실 분획물의 처리가 인체 대장암세포의 colony formation에 미치는 영향은 Franken 등[6]의 방법을 이용하여 측정하였다. 세포를 2×10^4 cells/ml로 배지를 이용하여 희석하고 24 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 시료는 DMEM 배지에 농도별로 희석하여 각

well에 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 배지를 제거하여 PBS를 이용하여 세척하고 6% glutaraldehyde 및 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 함유한 고정-염색 용액을 첨가하여 30분간 암실에 보관하였다. 염색이 끝난 후 증류수를 이용하여 각 well을 세척하고 건조시킨 후 well plate를 관찰하고 사진을 촬영하였다.

형태학적 관찰

매일 분획물의 처리에 따른 인체 대장암세포 형태학적 관찰은 세포를 1×10⁶ cells/ml로 배지를 이용하여 희석하고 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각각의 매일 분획물을 배지에 농도별로 희석하여 well plate에 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 세포의 형태학적 변화는 ×200의 배율로 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Gramany)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

Hoechst staining

암세포를 1×10⁶ cells/ml로 희석하고 6 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 시료를 농도별로 희석하여 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 세포를 수거하여 200 μl Hoechst 33258 (bis-benzimide, 1 μg/ml, Sigma-Aldrich)을 첨가하여 암실에서 10분간 염색하였다. 염색이 끝난 세포는 PBS로 2회 세척하고 염색된 핵은 형광현미경으로 관찰하였다.

Western blot

Western blot을 이용한 단백질의 발현 변화를 측정하기 위하여 monolayer로 배양한 인체 대장암세포를 1×10⁶ cells/ml가 되도록 희석하여 100 mm dish에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 시료를 농도별로 희석하여 처리한 후 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 세포는 회수하여 PBS로 3회 세척하고 lysis buffer를 이용하여 4°C에서 용해하였다. 세포 용해액과 sample buffer를 혼합하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel을 nitro-cellulose membrane으로 transfer하여 blocking buffer로 상온에서 1시간 교반하고 primary antibody (Bax, Bcl-2, caspase-3, PARP, SantaCruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 희석하여 4°C에서 overnight 하였다. 이후 T-TBS로 1시간 세척하고 secondary anti-rabbit IgG conjugated HRP를 희석하여 4°C에서 1시간 반응시킨 후 T-TBS로 세척한 후 암실에서 enhanced chemiluminenscence kit (ECL kit, GE Healthcare, Boston, MA, USA)를 사용하여 필름에 노출시킨 후 단백질의 발현을 확인하였다.

통계처리

통계분석은 각 시료군 간의 유의적인 변화를 one-way ANOVA로 분석하였으며, 3 반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 실시하여 판정하였다(**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

결과 및 고찰

매일 분획물의 처리가 인체 대장암세포의 증식에 미치는 영향

매일 분획물의 처리에 따른 인체 대장암세포주 2종의 성장 억제 효과를 알아보기 위하여 SRB assay를 통하여 알아보았다. SRB assay는 trichloroacetic acid (TCA)에 의하여 고정된 세포의 단백질에 염색된 SRB의 양에 따른 흡광도 측정을 하며 세포의 생존율을 확인하는 실험으로 널리 알려져 있다[33]. 인체 대장암세포 HT-29에서의 매일 분획물의 처리에 따른 세포 증식 억제 효과는 Fig. 1A와 같다. MMF를 24시간 처리하였을 때 100 μg/ml에서는 76.48%의 생존율을 보였으며, 가장 높은

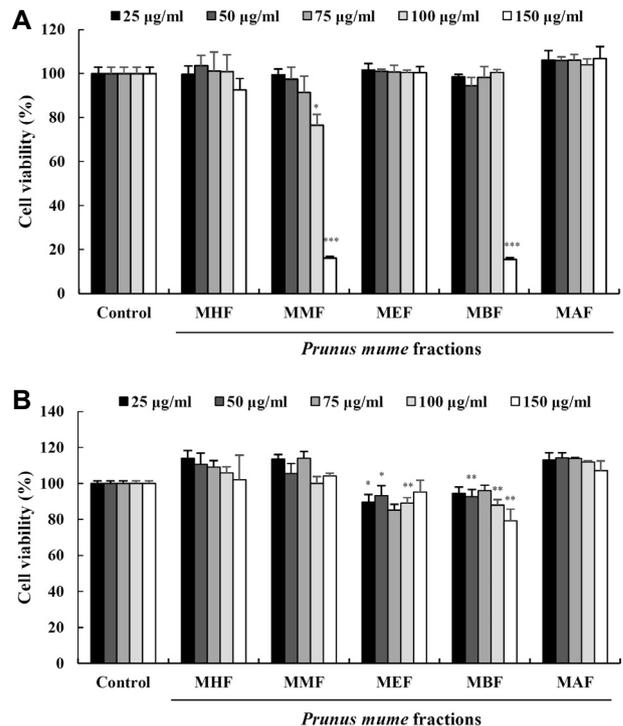


Fig. 1. Effect of *Prunus mume* fractions on cell growth of (A) human colon cancer HT-29 cells and (B) human colon cancer SW 480 cells. Cell viability was determined by SRB assay. MHF; maesil hexane fraction, MMF; maesil methanol fraction, MEF; maesil ethyl acetate fraction, MBF; maesil butanol fraction, MAF; maesil aqueous fraction. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at **p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.001 by student's *t*-test.

농도인 150 µg/ml에서는 16.04%의 세포 생존율을 나타내어 농도의존적인 세포 증식 억제효과를 보여주었다. MBF를 처리하였을 때 25, 50, 75 및 100 µg/ml의 농도에서는 세포 생존율에 유의한 변화를 나타내지 않았으나 150 µg/ml의 농도에서는 15.49%로 나타나 유의적인 세포 증식 억제효과를 보였다. 반면에, MHF, MBF 및 MAF의 농도별 처리에 따른 HT-29 인체 대장암세포의 생존율에는 큰 변화를 나타내지 않은 것으로 나타났다. Fig. 1B에서는 인체 대장암세포주인 SW480을 이용하여 매실 분획물의 처리에 따른 세포 생존율을 검토 하였다. MEF 및 MBF를 처리하였을 때 유의적인 세포 증식억제효과가 나타났으나, 효과적인 세포 성장 억제가 나타나지 않다. Bae 등[2]은 매실 추출물을 함유한 기능성 음료가 인체 대장암세포 SNU-C2A의 세포 성장을 효과적으로 억제하였다고 보고하였으며, Mori 등[24]은 인체 대장암세포 SW480, COLO 및 WiDr에 매실 추출 분말의 처리에 따라 autophagy를 통한 세포의 사멸을 유도한다고 보고된 바 있다. 본 연구결과의 매실 추출물을 이용하여 제조한 분획물의 대장암세포 성장 억제 효과는 이와 관련이 있다고 생각되었다. 또한 재배와송 분획물을 이용한 인체 대장암세포주의 세포 사멸 유도 효과를 알아본 연구에서는 chloroform 및 ethyl acetate 분획물이 효과적인 세포 성장 억제효과를 나타내었으며[18], 산초 분획물을 이용한 대장암세포에 대한 항암 연구에서는 ethyl acetate 분획물이 가장 효과적인 분획물로 보고 되었다[8]. 본 연구결과에서는 methanol 및 butanol 분획물이 효과적인 세포성장 억제효과를 보여 위의 보고와는 다른 결과이나 이는 용매와 시료의 차이에 따라 상이한 것으로 판단된다. 본 연구결과를 통해 매실 분획물의 처리에 따른 인체 대장암세포의 성장억제는 SW 480보다는 HT-29세포에서 더욱 민감성을 갖는 것으로 판단되었다. 특히 HT-29세포에서의 MMF 및 MBF의 IC50값은 각각 126.8 µg/ml 및 128.3 µg/ml로 나타나 추후 실험에서는 인체 대장암세포 HT-29세포를 이용하여 125 µg/ml의 농도를 최고 농도로 설정하여 세포 사멸 유도 효과를 확인하였다.

매실 분획물의 처리가 인체 대장암세포의 clone 형성에 미치는 영향

Clonogenic assay는 monolayer로 부착된 세포의 colony 형성능을 확인하는 실험으로서 50개 이상의 세포가 모여 colony를 형성하는데 시료의 처리에 따른 colony 형성능을 확인함에 따라 세포독성을 평가하는 시험 방법 중 하나이다[6]. MMF 및 MBF의 처리에 따른 HT-29 세포의 colony 형성에 미치는 영향을 알아본 결과는 Fig. 2와 같다. MMF 처리군에서는 농도의존적으로 colony 형성이 억제되는 경향을 보였으며, 특히 대조군과 비교하여 125 µg/ml의 농도군에서는 colony 형성능이 크게 감소한 것으로 나타났다. MBF를 처리한 군에서는 75 및 100 µg/ml의 농도에서는 큰 변화를 나타내지 않았으나 125 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 colony 형성능이 크게 억제되

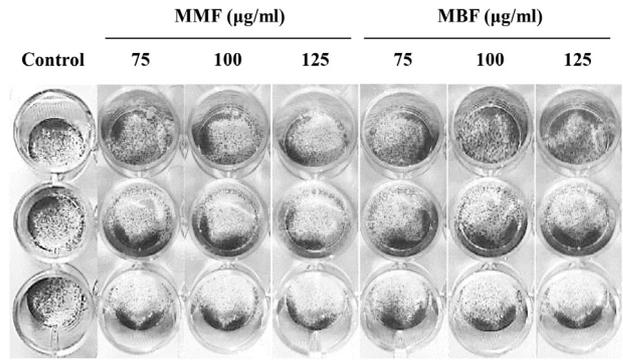


Fig. 2. Effect of *Prunus mume* fractions on single-cell proliferation of human colon cancer HT-29 cells. Cells were stained with crystal violet solution and colonies were photographed. MMF; maesil methanol fraction, MBF; maesil butanol fraction.

는 것으로 나타났다. 이에 앞선 SRB assay를 통한 결과에서 매실 분획물의 처리에 따른 세포 증식 억제효과에 따라 인체 대장암세포 HT-29세포의 colony 형성이 억제가 된 것을 확인할 수 있었다.

매실 분획물의 처리가 인체 대장암세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

매실 분획물의 처리에 따른 인체 대장암세포 HT-29의 형태학적 변화를 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군에서는 세포가 안정적으로 부착되어 세포가 정상적으로 증식하고 있는 모습을 확인할 수 있었으나, MMF를 처리한 군에서는 농도가 증가함에 따라 세포의 증식이 잘 이루어지지 않는 모습을 확인할 수 있었다. 특히 125 µg/ml의 농도에서는 세포가 부착되지 못하고 부유하는 모습과, 세포의 수가 감소된 것을 확인할 수 있었다. MBF 처리군에서는 75 및 100 µg/ml의 농도처리군에서는 대조군과 비교하여 형태학적 변화가 크지 않았으나, 125 µg/ml 농도를 처리하였을 때 세포의 증식이 억제되고, 세포의 수 또한 감소됨을 확인할 수 있었다.

매실 분획물의 처리가 인체 대장암세포의 apoptotic body 형성에 미치는 영향

Apoptosis에 의한 세포의 사멸 과정에서 apoptotic 세포가 형태학적으로 관찰되는데 대표적인 특징으로 세포질의 수축, 핵 응축 및 apoptotic body의 형성이 수반된다[9]. 매실 분획물의 처리에 의한 인체 대장암세포 HT-29의 증식 억제효과가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위하여 hoechst 33258을 이용한 염색을 통해 핵 형태의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군의 핵 형태는 비교적 일정하게 원형을 이루고 있는 반면, MMF 처리군에서는 농도의존적으로 핵 형태의 변화가 관찰되었다. 즉, 세포의 모양이 변형되었으며 핵이 손상됨에 따라 응축이 일어나는 것을 확인할 수 있었으며, apoptosis

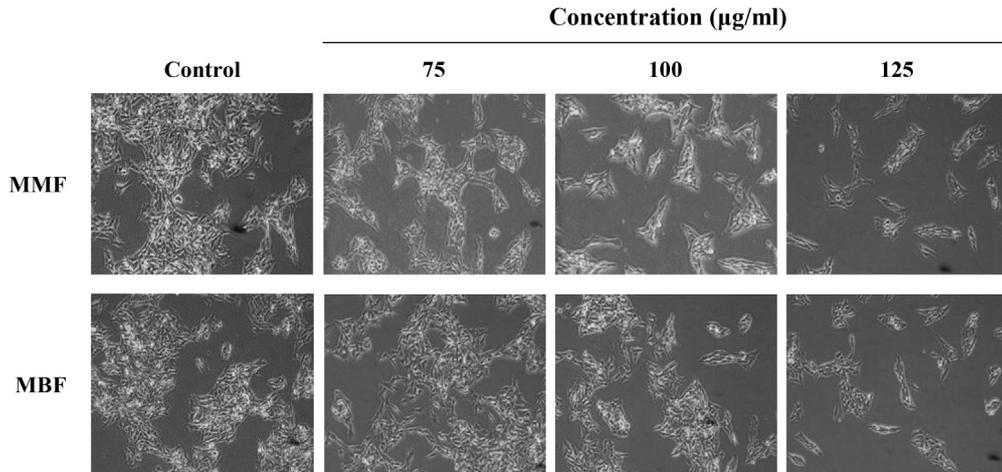


Fig. 3. Effect of *Prunus mume* fractions on proliferation of human colon cancer HT-29 cells. Cell morphology was visualized by optical microscopy (×200). MMF; maesil methanol fraction, MBF; maesil butanol fraction.

의 특징인 apoptotic body의 형성이 확인되었다. MBF 처리군에서는 75 및 100 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 큰 변화가 없는 것으로 나타났으나 125 µg/ml의 농도에서 확연히 나타났다. Kim 등[16]은 매실 농축액이 풍부한 페놀화합물을 보유한 것으로 보고하였으며, Verma 등[32]은 식물체 유래 페놀화합물이 암세포의 사멸에 영향을 미친다고 보고하였다. 이에 MMF 및 MBF의 처리에 따른 인체 대장암세포 증식 억제효과가 apoptosis와 관련이 있는 것으로 판단되며, 이는 매실 분획물 내 풍부한 페놀성 화합물에 기인한 것으로 생각된다.

매실 분획물의 처리가 인체 대장암세포의 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Apoptosis가 일어나는 경로는 크게 mitochondrial pathway라고 알려진 내인성 경로와 death receptor pathway인 외인성 경로로 나뉘어 알려져 있다[7]. 특히 그 중 내인성경로에

서 Bcl-2/Bax family에 의한 단백질 발현의 조절은 세포의 apoptosis과정에서 대표적인 단백질이다[11]. Bcl-2는 anti-apoptotic 단백질로서 암세포의 apoptosis를 억제하는 반면 pro-apoptotic 단백질인 Bax는 apoptosis를 유도하는 역할을 하며 Bcl-2과 Bax의 상대적인 발현 감소는 mitochondria로부터 cytochrome c의 유리를 촉진하여 종양 억제 유전자인 p53 및 caspase의 활성화에 의하여 DNA 손상을 복구하는 PARP 단백질의 분절이 일어나고 결과적으로는 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다[34]. 매실 분획물의 처리가 인체 대장암세포 HT-29의 apoptosis 관련 단백질에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 apoptosis 이전에 관여하는 단백질의 변화를 western blot을 통하여 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. HT-29세포에 MMF를 농도별로 처리하였을 때 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현은 농도의존적으로 증가한 반면 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소하는 것으로 나타났

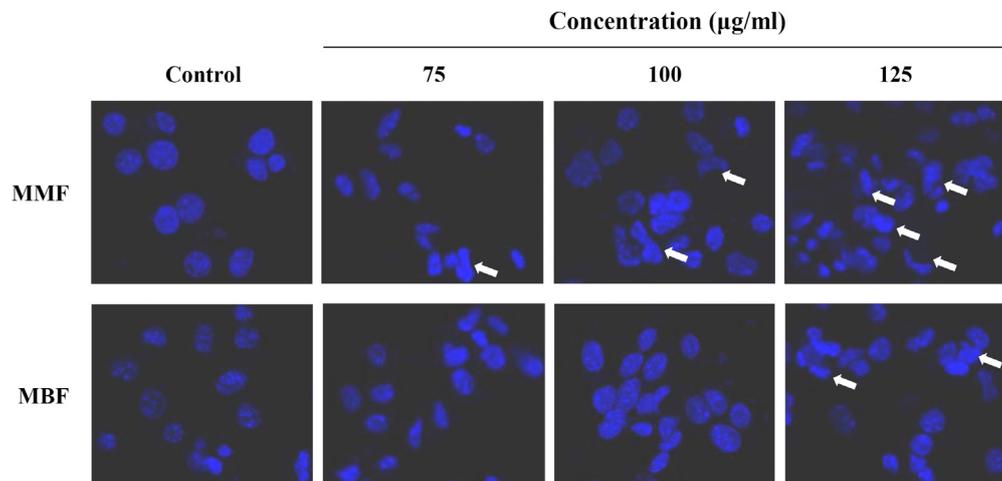


Fig. 4. Effect of *Prunus mume* fractions on nuclear fragmentation in human colon cancer HT-29 cells. Cells were stained with 10 µg/ml of Hoechst 33258 and examined by fluorescence. MMF; maesil methanol fraction, MBF; maesil butanol fraction.

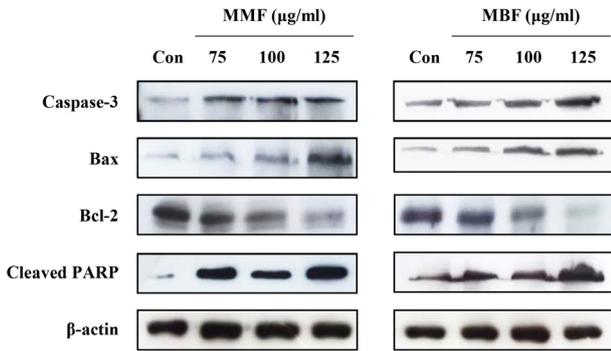


Fig. 5. Effect of *Prunus mume* fractions on expression of Bcl-2 family protein and caspase activation in human colon cancer HT-29 cells. Cells were treated with fractions for 24 hr. Caspase-3, Bcl-2, Bax and cleaved PARP was assessed by western blot analysis. Cell lysates were subjected to 12% SDS-PAGE. MMF; maesil methanol fraction, MBF; maesil butanol fraction.

다(Fig. 5A). 또한 apoptosis 유도 과정에서 중요한 조절인자인 caspase-3의 활성이 증가한 것으로 나타났으며, 분절된 PARP의 발현 또한 증가하는 것으로 확인되었다. Park 등[25]은 매실 추출물의 처리에 따라 인체 백혈병세포의 apoptosis가 내인성 경로를 통하여 유도된다고 보고하였으며, Tada 등[31]은 매실 추출 분말의 처리가 A375 melanoma cell의 ERK1/2 경로의 억제와 Bcl-2 단백질의 발현을 감소시킴으로써 세포의 apoptosis를 유도하였다고 보고하였다. 이에 본 연구결과에서의 매실 분획물의 처리에 따른 apoptosis 유도 효과가 내인성 경로와 밀접한 연관이 있는 것으로 판단되었으나 외인성 경로에 대한 연구는 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

매실 분획물의 처리가 환경호르몬에 의해 유도된 인체 대장 암세포의 증식에 미치는 영향

환경호르몬은 생체의 호르몬 기능에 변화를 일으킬 수 있는 유해 화학물질로서 체내 호르몬 생산, 분비 및 배설 등에 작용하여 교란을 유발하는 물질을 총칭한다[29]. 대표적인 환경호르몬인 bisphenol A (BPA)는 주로 플라스틱 제품의 원료로 사용되며 강한 세제를 사용하거나, 고열을 가할 시에 용출되며 체내 과량 흡수된 경우 체내 호르몬 균형을 잃게 하거나 뇌에 영향을 미칠 수 있으며, 태반을 통하여 태아에서도 검출되기 때문에 인체에 미치는 영향에 관심이 집중되어지고 있다[28]. 인체 대장암세포인 HT-29에 bisphenol A를 cFBS를 함유한 배지를 이용하여 0.1 µM의 농도로 처리하여 대장암세포의 증식을 유도시킨 후 MMF 및 MBF를 75, 100 및 125 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 배양시킨 후 SRB assay를 통하여 생존율을 검토한 결과는 Fig. 6과 같다. 즉 BPA를 처리한 군은 대조군보다 유의적으로 세포생존율이 증가하여 암세포의 증식이 활발해진 것으로 나타났으며, MMF의 처리에 의하여 유의적으로 세포의 증식이 억제되어 125 µg/ml의 농도에

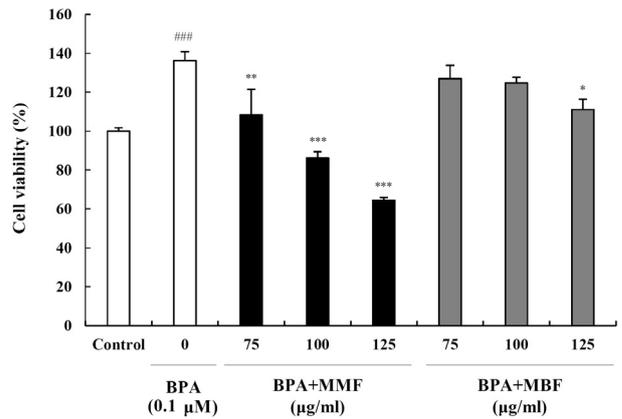


Fig. 6. Effect of *Prunus mume* fractions on bisphenol A-induced proliferation in human colon cancer HT-29 cells. Cell viability was determined by SRB assay. MMF; maesil methanol fraction, MBF; maesil butanol fraction. Data values are expressed as mean as SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at ^{###}*p*<0.001, and with BPA control (1% cFBS) at *p*<0.05, ^{**}*p*<0.01 and ^{***}*p*<0.001 by student's *t*-test.

서는 64.42%의 세포 생존율을 나타내어 MMF가 BPA에 의한 대장암세포의 성장을 억제하는 것을 확인하였다. 그러나 MBF 처리군에서는 BPA 대조군과 비교하여 125 µg/ml의 농도에서 유의적인 성장 억제 효과를 확인할 수 있었으나, 효과적이지 못한 성장 억제효과를 보였다. Kwon 등[20]은 인체 전립선 암세포에서 환경호르몬에 의한 증식이 산수유 추출물의 처리에 따라 억제됨을 보고하였으며, Park 등[28]은 당귀에서 추출한 decursin의 처리에 의하여 환경호르몬으로 유도된 MCF-7 유방세포의 증식을 억제하였다고 보고하였다. 이상의 결과로 향후 보다 깊이 있는 연구가 필요하지만 매실 분획물의 처리는 환경호르몬에 의한 대장암세포의 비정상적인 증식을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농생명기술개발사업의 지원을 받아 연구되었기에 이에 감사드립니다(316009-5).

References

- Andersen, C., Adamsen, L., Moeller, T., Midtgaard, J., Quist, M., Tveteraas, A. and Rorth, M. 2006. The effect of a multi-dimensional exercise programme on symptoms and side-effects in cancer patients undergoing chemotherapy-The use of semi-structured diaries. *Eur. J. Oncol. Nurs.* **10**, 247-262.
- Bae, J. H., Kim, K. J., Kim, S. M., Lee, W. J. and Lee, S. J. 2000. Development of the functional beverage containing the *Prunus mume* extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 713-

- 719.
3. Banerjee, A., Pathak, S., Subramaniam, V. D., Dharanicasan, G., Murugesan, R. and Verama, R. S. 2017. Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. *Drug Discov. Today* **22**, 1224-1232.
 4. Cho, H. D., Kim, J. H., Hong, S. M., Lee, J. H., Kim, D. H. and Seo, K. I. 2016. Sorghum extract enhances caspase-dependent apoptosis in primary prostate cancer cells and immune activity in macrophages. *J. Life Sci.* **26**, 1431-1437.
 5. Debatin, K. M. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 153-159.
 6. Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.* **1**, 2315-2319.
 7. Gupta, S. 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* **69**, 2957-2964.
 8. Han, W., Hu, W. and Lee, Y. M. 2011. Anti-cancer activity of human colon cancer (HT-29) cell line from different fraction of *Zanthoxylum schinifolium* fruits. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**, 282-287.
 9. Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 1-23.
 10. Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **12**, 770-776.
 11. Hong, S. M., Cho, H. D., Kim, J. H., Lee, J. H., Song, W. S., Lee, S. T., Lee, M. K. and Seo, K. I. 2016. Anti-proliferative effects of acid extract of *Gracilaria verrucosa* on primary human prostate cancer cells. *J. Life Sci.* **26**, 1130-1136.
 12. Hwang, J. Y., Ham, J. W. and Nam, S. H. 2004. The antioxidant activity of maesil (*Prunus mume*). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 461-464.
 13. Im, S. J., Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Endogenous nitric oxide strengthens doxorubicin-induced apoptosis in human colorectal cell lines. *J. Life Sci.* **24**, 1137-1143.
 14. Jung, K. M., Won, Y. J., Kong, H. J. and Lee, E. S. 2019. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2019. *Cancer Res. Treat.* **51**, 431-437.
 15. Kang, M. Y., Jeong, Y. H. and Eun, J. B. 1999. Physical and chemical characteristics of flesh and pomace of Japanese apricots (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1434-1439.
 16. Kim, J. H., Cho, H. D., Won, Y. S., Park, W. L., Lee, K. W., Kim, H. J. and Seo, K. I. 2018. Physiological activity and physicochemical properties of condensed *Prunus mume* juice prepared with pectinase. *J. Life Sci.* **28**, 1369-1378.
 17. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2015. Anticancer effect of citrus fruit prepared by gamma irradiation of budsticks. *J. Life Sci.* **25**, 1051-1058.
 18. Kim, J. Y., Jung, E. J., Won, Y. S., Lee, J. H., Shin, D. Y. and Seo, K. I. 2012. Cultivated *Orostachys japonicus* induces apoptosis in human colon cancer cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 317-323.
 19. Kim, E. J., Lee, H. J., Jang, J. W., Kim, I. Y., Kim, D. H., Kim, H. A., Lee, S. M., Jang, H. W., Kim, S. Y., Jang, Y. M., Im, D. K. and Lee, S. H. 2010. Analytical determination of cyanide in maesil (*Prunus mume*) extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 130-135.
 20. Kwon, S. H., Kwon, S. J., Kim, J. Y., Park, K. W., Shim, K. H. and Seo, K. I. 2009. Protective effect of *Corni fructus* ethanol extracts against environmental hormones in human prostate cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 663-666.
 21. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C. 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **22**, 346-347.
 22. Lee, H. A., Nam, E. S. and Park, S. I. 2003. Antimicrobial activity of maesil (*Prunus mume*) juice against selected pathogenic microorganisms. *Kor. J. Food Nutr.* **16**, 29-34.
 23. Mitani, T., Ota, K., Inaba, N., Kishida, K. and Koyama, H. A. 2018. Antimicrobial activity of the phenolic compounds of *Prunus mume* against enterobacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 208-212.
 24. Mori, S., Sawada, T., Okada, T., Ohsawa, T., Adachi, M. and Keiichi, K. 2007. New anti-proliferative agent, MK615, from Japanese apricot "*Prunus mume*" induces striking autophagy in colon cancer cells *in vitro*. *World J. Gastroenterol.* **13**, 6512-6517.
 25. Park, C., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Jeong, Y. K., Kim, W. J. and Choi, Y. H. 2011. Induction of apoptosis by ethanol extracts of *Prunus mume* in U937 human leukemia cells through activation of caspases. *Oncol. Rep.* **26**, 987-993.
 26. Park, H. J., Jin, S. J., Oh, Y. N., Kim, B. W. and Kwon, H. J. 2015. Induction of apoptosis by methanol extract of *Endlicheria anomala* in human lung and liver cancer cells. *J. Life Sci.* **25**, 441-449.
 27. Park, H. J., Kim, M. M. and Oh, Y. H. 2012. Effect of fruit extract of *Prunus mume* on the scavenging activity of reactive oxygen species and melanin production in B16F1 cells. *J. Life Sci.* **22**, 936-942.
 28. Park, K. W., Choi, S. R., Yang, H. S., Cho, H. W., Kanf, K. S. and Seo, K. I. 2007. Anti-proliferation effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in the MCF-7 cells treated with environmental hormones. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 825-831.
 29. Poland, A. and Knutson, J. C. 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**, 517-554.
 30. Shin, S. Y., Kim, Y. J., Song, K. S., Jing, K., Kim, N. Y., Jeong, S. Y., Park, J. H., Seo, K. S., Heo, J. Y., Kwon, H. J., Park, J. I., Park, S. K., Kweon, G. R., Yoon, W. H., Hwang, B. D. and Kim, K. 2010. Mechanism of anti-invasive action of docosahexaenoic acid in SW480 human colon cancer cell. *J. Life Sci.* **20**, 561-571.
 31. Tada, K., Kawahara, K., Matsushita, S., Hashiguchi, T., Maruyama, I. and Kanekura, T. 2012. MK615, a *Prunus mume* Steb. Et Zucc ('Ume') extract, attenuates the growth of A375 melanoma cells by inhibiting the ERK1/2-Id-1 pathway. *Phytother. Res.* **26**, 833-838.

32. Verma, A. K., Johnson, J. A., Gould, M. N. and Tanner, M. A. 1988. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* **63**, 3037-3042.
33. Vichai, V. and Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112-1116.
34. Yu, F. Watts, R. N., Zhang, X. D., Borrow, J. M. and Hersey, P. 2006. Involvement of BH3-only proapoptotic proteins in mitochondrial-dependent Phenoxodiol-induced apoptosis of human melanoma cells. *Anticancer Drugs* **17**, 1151-1161.

초록 : 매실 분획물에 의한 인체 대장암세포 억제 효과

김정호¹ · 조현동² · 원영선³ · 허지안³ · 김지영³ · 김휘곤³ · 한심희⁴ · 문광덕¹ · 서권일^{3*}

(¹경북대학교 식품공학부, ²동아대학교 산학협력단, ³동아대학교 생명공학과, ⁴국립산림과학원 산림생명자원부)

매실은 한국, 일본 및 중국 등지에서 섭취하여온 과실로서 유기산이 풍부하며, 다량의 무기질 및 폴리페놀 성분을 함유한 것으로 알려져 있다. 이러한 매실을 이용하여 예로부터 절임이나 청 등으로 가공하여 섭취할 뿐만 아니라 구토, 해독 및 해열에 효능이 있는 한약재로서 사용해왔다. 본 연구에서는 매실을 이용하여 분획물을 제조하고 각각의 인체 대장암세포에 대한 성장 억제효과를 확인하였으며, colony 형성능, 형태학적 관찰, apoptotic body 형성, 단백질 변화 및 환경호르몬에 대한 방어 효과를 평가하였다. 매실 분획물의 인체 대장암세포 HT-29에 대한 증식 억제효과는 매실 메탄올 분획물(maesil methanol fraction, MMF) 및 매실 부탄올 분획물(maesil, butanol fraction, MBF)이 가장 뛰어난 효능을 나타내었다. MMF 및 MBF의 처리에 따라 colony 형성능 또한 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났으며 형태학적 변화 또한 확인할 수 있었다. 핵의 형태학적 변화를 관찰한 결과 125 µg/ml의 MMF 및 MBF 처리에 따라 apoptotic body의 형성 및 핵 응축을 관찰하였다. MMF 및 MBF의 처리에 따른 인체 대장암세포의 성장 억제효과가 apoptosis 와 관련이 있는지 단백질의 변화를 확인한 결과, pro-apoptotic 단백질은 Bax, caspase-3, PARP의 발현이 농도의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소하는 경향을 나타냈다. 또한, 환경호르몬의 일종은 bisphenol A (BPA)에 의해 성장이 증식된 HT-29세포는 MMF의 처리에 따라 유의적인 성장억제 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 얻은 결과는 매실 분획물을 이용한 기능성 식품 소재화에 대한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.