

## Induction of Apoptosis by Treatment of Human Prostate Cancer LNCaP Cells with Methanol Fractions from *Prunus mume*

Hwi-gon Kim<sup>1</sup>, Jeong-Ho Kim<sup>2</sup>, Ji-An Heo<sup>3</sup>, Yeong-Seon Won<sup>3</sup> and Kwon-Il Seo<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Bioscience, Dong-A University, Busan 49315, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

Received November 3, 2020 / Revised December 16, 2020 / Accepted December 16, 2020

This study examined the growth inhibitory effect of the methanol fraction of maesil (*Prunus mume*) extract (MMF) on LNCaP, PC-3, and RC-58T human prostate cancer cell lines. Among these cell lines, LNCaP was the most sensitive to the inhibitory effects of MMF. Observation of the morphology and apoptotic body formation in the LNCaP cells revealed morphological changes, nuclear damage, and condensation in response to MMF treatment. The suppressive effect of MMF was related to the intrinsic apoptosis pathway, as indicated by increased expression of the pro-apoptotic proteins Bax, caspase-3, caspase-9, and PARP and decreased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. Combined treatment with MMF and the AIF inhibitor N-phenylmaleimide (N-PM) indicated that MMF treatment alone had a significant growth suppression effect. The involvement of the extrinsic apoptosis pathway was also confirmed by increased expression of AIF and Endo G. The growth suppression effect of MMF was also significant when compared to the effects of a combination of the PI3K inhibitor LY294002 and MMF. The reduced expression of PI3K, p-Akt, and p-mTOR confirmed the involvement of the PI3K/Akt/ mTOR signaling pathway in regulating the anti-proliferative properties of MMF. In conclusion, the growth suppression effect of MMF in the LNCaP human prostate cancer cell line shows the possibility of using this natural product in functional foods.

**Key words** : Apoptosis, human prostate cancer, LNCaP cells, maesil, methanol fraction

### 서 론

암은 외부자극에 의해 정상 세포의 유전자에 변형이 일어나 무제한 증식을 하여 형성된 악성 종양이다[24]. 최근 전 세계적으로 질병에 의한 사망 비율의 절반이 암에 의한 사망이라 할 수 있을 만큼 암이 주된 원인이 되었으며, 통계적으로 매년 암으로 인한 사망률이 증가하는 추세를 보이고 있다[27, 33]. 특히, 전립선암은 침습성이 강한 악성 종양으로, 미국 남성 암 환자 사망률 2위를 나타내고 있다[48, 50]. 전립선암은 주로 선진국에서 흔히 발생하는 질병이었으나, 현재 국내에서도 인구의 고령화, 서구화된 식생활 및 외부적인 스트레스 등의 사회적 및 환경적 요인으로 인해 발생 및 사망 빈도가 점차 증가하고 있어 암에 대한 연구에 관심이 집중되고 있다[23, 27, 48]. 이러한 전립선암의 치료방법으로는 수술 요법, 항암 치료요법 및 방사선 치료요법 등이 이용되고 있으며, 그 중 항암 치료요

법에 사용되고 있는 기존의 항암제들은 유전자 손상, 조혈 장애, 탈모 및 면역 기능 저하와 같은 부작용을 유발할 수 있다 [26, 32]. 반면, 천연물 유래 소재는 독성에 대한 부작용을 최소화하기 때문에 암의 효과적인 치료를 기대할 수 있다[6]. 따라서 기존의 항암제에 비해 독성과 부작용이 낮고, 뛰어난 항암 효과를 가지는 천연자원을 이용하여 암의 치료를 위한 지속적인 연구가 이루어져야 할 필요가 있다.

최근 연구에 의하면 많은 천연소재들이 암세포의 세포사멸을 유도하여 암의 발생 및 진행을 억제한 것으로 관찰되었다 [5-7, 44]. 이러한 세포사멸은 세포의 형태학적 및 생화학적 특성에 따라 서로 다른 기전을 가지는 세포괴사(necrosis)와 세포자멸사(apoptosis)의 과정을 통해 일어난다[15, 19, 40]. 세포괴사(necrosis)는 에너지 비 의존적이며, 물의 유입, 이온 농도의 변화 및 세포의 팽창과 같은 조절되지 않는 상태로 유발되는 세포의 죽음이고 손상된 원형질막을 통해 세포질의 성분이 염증 반응을 유발할 수 있다[43]. 이와 달리 programmed cell death라 불리는 세포자멸사(apoptosis)는 개체 발생 단계, DNA 손상 및 바이러스 감염 등으로부터의 방어 기전이며 손상된 세포들을 제거하는 중요한 수단이기 때문에 항암연구에서 apoptosis의 연구가 필수적이다[15, 21]. 이러한 apoptosis는 intrinsic pathway (mitochondrial-mediated) 또는 extrinsic pathway (death receptor-mediated) 두 경로를 통해 일어날

#### \*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.

수 있다[12, 22]. 비록 두 경로에서 활성이 유도되는 initiator caspase는 다르지만, 최종적으로 effector caspase의 활성으로 DNA 절편화와 기질 단백질의 분해로 인하여 apoptosis가 유발된다[11, 12, 22].

장미과에 속하는 매실(*Prunus mume* Sieb. Et Zucc)은 아시아 동부지역에서 주로 재배되고 있으며 3~4월 잎이 나기 전에 꽃이 피고, 6~7월경 열매를 수확한다. 매실은 한의학에서 '오매'로 불리며 해독, 지리, 거담 및 구충 등에 효과가 있어 예로부터 사용되어 왔다[45]. 또한 이를 이용하여 매실 엑기스, 매실주, 매실 장아찌 등으로 다양하게 가공되고 있다[2, 25]. 매실의 주요성분으로는 malic acid, succinic acid 및 citric acid 등의 풍부한 유기산과 P, K, Ca과 같은 다량의 무기질뿐만 아니라 tannin과 rutin 등 플라보노이드 및 페놀성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[25, 26, 34, 49]. Cho 등[9]은 매실추출물의 처리에 따른 인체 대장암세포 SW480의 성장억제효과 및 인체혈관내피세포의 혈관신생억제 효과에 대해 보고한 바 있으며, Kim 등[28]은 매실 메탄올 분획물의 처리에 따른 인체 대장암세포 HT-29에서 증식억제 효과를 나타낸 연구가 보고된 바 있다. Kim 등[29]은 pectinase 처리를 한 매실에 대한 항산화활성과 피부암세포 B16, Sk-MEL-2 및 SK-MEL-28에 대한 증식억제 효과, Kim 등[30]은 매실 분획물의 항산화 활성을 비교한 결과 매실 메탄올 분획물이 다량의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있으며 우수한 항산화 활성을 보고한 바 있다.

매실에는 다양한 활성성분을 가지고 있으며 그 활성 물질로는 oleanic acid, ursolic acid, lupeol 등의 성분을 포함한다[3]. Shi 등은[46] 매실 유래 quinic acid의 항산화 효능, Jeong 등[20]은 매실 유래 prunate 처리에 따라 Hep-2, SW156, HEC-1-B 및 SK-OV-3 등의 세포주의 성장억제 효과를 보고한 바 있다. 이러한 매실의 약리학적 효능에 대한 연구로는 항암, 간기능 회복, 항균 활성, 항산화, 지방축적 개선 효능 등의 연구가 보고된 바 있다[2, 16, 18, 39, 45, 47]. 그러나 기존의 연구는 대부분 매실 추출물을 이용한 연구로써 매실 분획물의 생리활성에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이며 특히 매실 메탄올 분획물(maesil methanol fraction, MMF)의 인체 전립선암세포 사멸에 관련된 연구는 거의 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 성장 억제 효능 및 apoptosis 유도 효과를 확인하였으며 이를 기능성 소재로의 이용가능성을 제시하는 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### MMF의 제조

매실 분획물의 재료는 이전 연구와 동일한 방법으로 제조하여 실험에 사용하였다[28, 30]. 세척한 매실은 씨를 제거 후 파쇄하여 EtOH을 1:1(w/v)로 첨가하여 24시간 동안 추출했

다. 추출물은 3,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 Whatman filter paper와 Büchner funnel을 이용하여 감압여과를 실시하였다. 이후 수득된 여액은 동결 건조를 진행하여 매실 추출물을 획득하였다. 매실 추출물은 dichloromethane (DCM)과 물을 이용하여 1:10:10(w/v/v)의 비율로 현탁 후 DCM fraction을 농축하고 hexane (Hex)과 methanol (MeOH)을 이용해 1:10:10(w/v/v)로 분획하여 MMF를 획득 후 감압여과 및 동결건조 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 실험에 이용되었다.

### 인체 전립선암세포 배양

실험에서 사용된 인체 전립선암세포 LNCaP, PC-3 및 RC-58T은 ATCC (Rockville, ND, USA)으로부터 분양 받았다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, MD, USA)에 추가적으로 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO®/Invitrogen™)와 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic (GIBCO®/Invitrogen™, GranIsland, NY, USA) 첨가하였다. 이렇게 제조된 배지를 이용하여 인체 전립선암세포를 incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 계대배양하여 실험에 사용하였다.

### Sulforhodamine B (SRB) assay

MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포의 증식억제 효과는 Vichai & Kirtikara [51]의 방법을 이용하여 알아보았다. 세포를  $3 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 배지를 첨가해 희석한 후 48 well plate에 분주하였다. 24시간 동안 배양한 후 시료를 DMEM에 농도별로 희석하여 제조한 후 24시간 처리하였다. 배양이 종료된 후 12% trichloroacetic acid (TCA)를 넣어 4 °C에서 고정하였으며 이후 0.4% SRB solution을 첨가하고 암실에서 염색하고 1% acetic acid 용액으로 well을 세척한 후 건조하였다. 세포 내 염색된 SRB는 10 mM Tris buffer를 이용해 녹여낸 후 상등액을 96 well plate에 옮겨 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 측정에 이용된 기기는 microplate reader (Multiskan Plus, Labsystems, Espoo, Finland)이며, 측정된 값은 대조군의 값을 기준으로 참고하여 결과를 나타내었다.

### 형태학적 관찰

MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 형태학적 관찰은  $3 \times 10^4$  cells/ml로 6 well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. MMF는 배지를 이용해 희석하여 6 well plate에 분주하고 24시간 동안 반응시켰다. 배양이 종료된 후 세포의 형태학적 변화는  $\times 200$ 의 배율로 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

### Hoechst staining

인체 전립선암세포 LNCaP을  $1 \times 10^6$  cells/ml로 희석하여 6 well plate에 분주하였다. CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한

후 MMF를 DMEM을 사용해 각 농도 별로 희석하여 처리한 후 추가적으로 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 세포는 trypsin-EDTA 처리를 이용해 수거하여 Hoechst 33258 (bis-benzimide, 1 µg/ml, Sigma-Aldrich) 200 µl를 처리한 후 암실에서 10분간 염색하였다. 염색 반응 시간이 끝난 LNCaP은 PBS로 세척을 2회 반복 진행하고 염색된 세포의 사진 촬영은 공초점 레이저 주사현미경(CLSM, Confocal laser scanning Microscope, Carl Zeiss, busan, korea)으로 촬영이 진행되었다.

### Western blot

단백질의 발현 변화는 Western blot을 통해 확인하고자 monolayer로 배양한 인체 전립선암세포 LNCaP을  $3 \times 10^4$  cells/ml로 희석하여 100 mm cell culture dish에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 MMF를 각 농도별로 DMEM을 이용해 희석하여 24시간 동안 처리하였다. 배양이 종료된 세포는 희석하여 PBS로 세척한 후 cell lysis buffer를 이용하여 4°C에서 세포용해가 진행되었다. Cell lysate와 sample buffer를 1:1로 혼합한 뒤, 5분간 65°C에서 반응시킨 후 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 진행된 gel을 nitro-cellulose membrane로 transfer하였다. 상온에서 1시간 동안 blocking buffer로 교반 한 뒤, primary antibody (Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9, PARP, AIF, Endo G, PI3K, Akt, p-Akt, mTOR 및 p-mTOR (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 첨가하여 4°C에서 overnight하였다. 이후 T-TBS로 1시간 동안 세척을 진행하고 secondary anti-rabbit IgG conjugated HRP를 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 반응하였다. 이후 암실에서 enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare, Boston, MA, USA) 시약을 이용하여 필름에 노출시킨 후 단백질의 발현을 확인하였다. 단백질의 발현을 나타내기 위해 imagej 소프트웨어를 이용하여 수치화한 후 각 단백질의 값을  $\beta$ -actin의 값으로 나눈 수치를 ratio 값으로 표시하였다.

### 통계처리

본 실험에서 이용된 통계분석은 one-way ANOVA의 방법으로 시료군 간의 유의적인 변화를 분석하였으며, 평균값과 표준편차로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성 검증은 student's *t*-test로 판정하였다(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 결과 및 고찰

### MMF의 처리가 인체 전립선암세포의 증식에 미치는 영향

인체 전립선암세포에서 MMF의 증식억제 효과를 알아보기 위해 SRB assay를 진행하였다. SRB assay는 세포 생존율을 확인하기 위한 실험법으로 trichloroacetic acid (TCA)를 통해 세포 고정을 진행하며 세포의 단백질에 SRB 시약을 통해 염색

되는 양을 흡광도를 측정함으로써 생존한 세포의 비율을 확인하는 실험이다[50]. MMF의 처리가 인체 전립선암세포의 세포 생존율에 미치는 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 인체 전립선암세포 LNCaP, PC-3 및 RC-58T에 MMF를 100, 150, 200 및 250 µg/ml의 농도로 각각 24시간 동안 처리한 결과, PC-3 및 RC-58T에서는 유의적인 세포 증식 억제가 나타나지 않았으나 LNCaP에서 가장 효과적인 증식억제가 일어난 것으로 나타났다(Fig. 1A). 이에 따라 인체 전립선암세포 LNCaP에 대한 MMF의 영향을 확인하기 위해 100 µg/ml부터 500 µg/ml 농도의 MMF를 처리하여 SRB assay를 통한 증식억제 효과를 확인한 결과는 Fig. 1B에 나타내었다. MMF의 처리에 따라 농도의존적인 LNCaP 세포의 유의적인 세포 증식 억제가 확인되었다. 매질 추출물에 대한 이전 연구에서는 인체 백혈구 세포 U937, 대장암 세포 HRT-18, HCT-48 및 HT-29에서 증식억제 효과가 보고되었다[10, 35]. Abou baker [1]가 보고한 바에 따르면 *Achillea millefolium* L.의 추출물보다 분획물을 처리하였을 때 자궁경부암세포인 HeLa에서 apoptosis 활성과 cell cycle arrest가 더 높게 나타났고, Park 등[42] *Echinacea purpurea*을 이용한 추출물 보다 분획물의 처리가 암세포 Hep3B, AGS, MCF7, A549에 대한 독성이 더 높게 나타낸다고 보고하였고, Lim 등[36]도 메주를 이용한 추출물 보다 분획물이 위암 세포 AGS에서 증식억제 효과를 보고한 바 있다. 본 연구에서도 분획물을 처리한 다른 연구와 비슷한 경향으로 인체 전립선암세포 LNCaP의 증식억제 효과가 나타나 매질 추출물보다 메탄올 분획물의 세포성장 억제효과가 높을 것으로 사료된다. 특히 MMF의 처리는 인체 전립선암세포 LNCaP에서 PC-3 및 RC-58T 세포보다 민감한 증식억제 효과를 보이며 MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP에 증식억제 효과를 확인하였다.

### MMF의 인체 전립선암세포 LNCaP 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

인체 전립선암세포 LNCaP에 MMF를 처리하였을 때, 형태학적 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2에 나타났다. MMF를 처리한 경우 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 세포의 사멸이 증가하여 부유세포가 증가한 것을 알 수 있었다. 특히 400 µg/ml 농도에서 세포 증식이 크게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

### MMF의 처리가 인체 전립선암세포 LNCaP에서 apoptotic body 형성에 미치는 영향

Apoptotic body는 세포내 apoptosis가 발생할 경우 세포에서 세포질의 응축과 핵 응축과 더불어 발생하는 현상으로 형태학적으로 관찰이 가능하다[52]. MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 세포성장억제 효과가 apoptosis에 의한 효과인지 확인하기 위해 Hoeschst 33258을 이용한 염색을 통해 형광현미경으로 apoptotic body의 형성을 관찰한 결과는

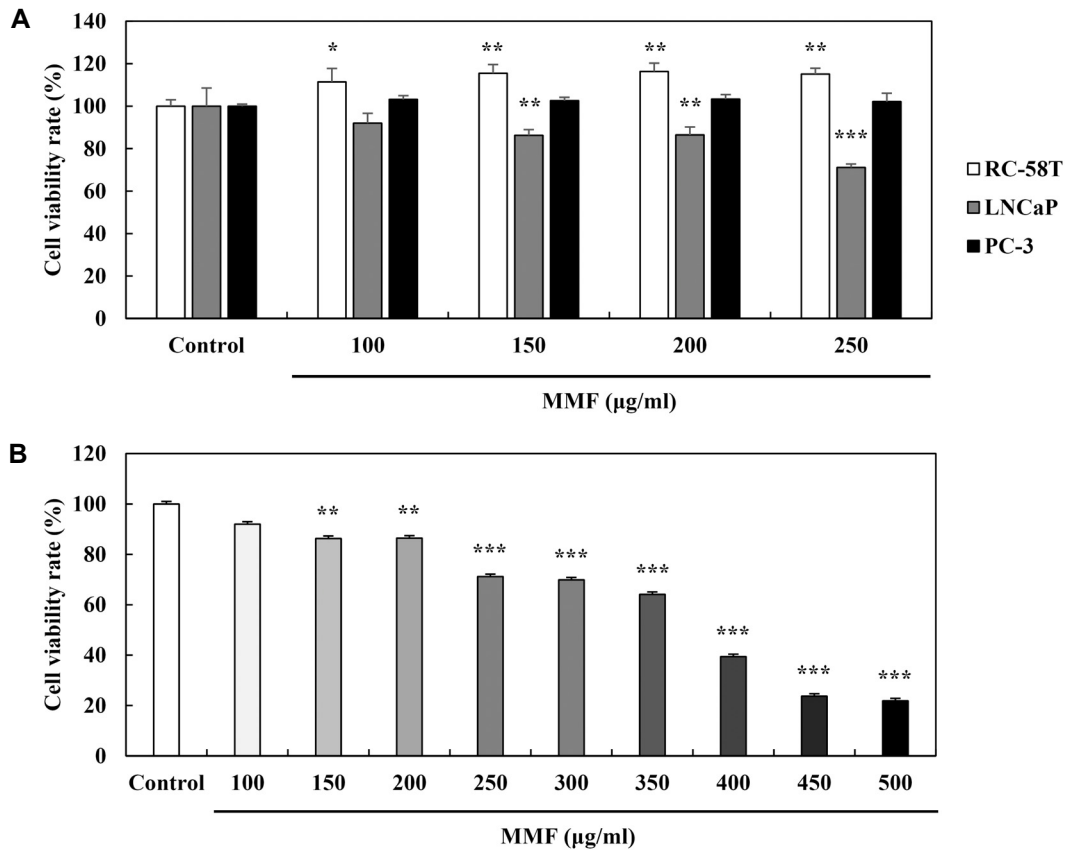


Fig. 1. Cell growth inhibitory effect on human prostate cancer cell. (A) RC-58T, LNCaP and PC-3 treated with MMF for 24 hr by SRB assay. (B) LNCaP treated with MMF for 24 hr by SRB assay. Data values are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 by student's t-test. MMF: maesil methanol fraction.

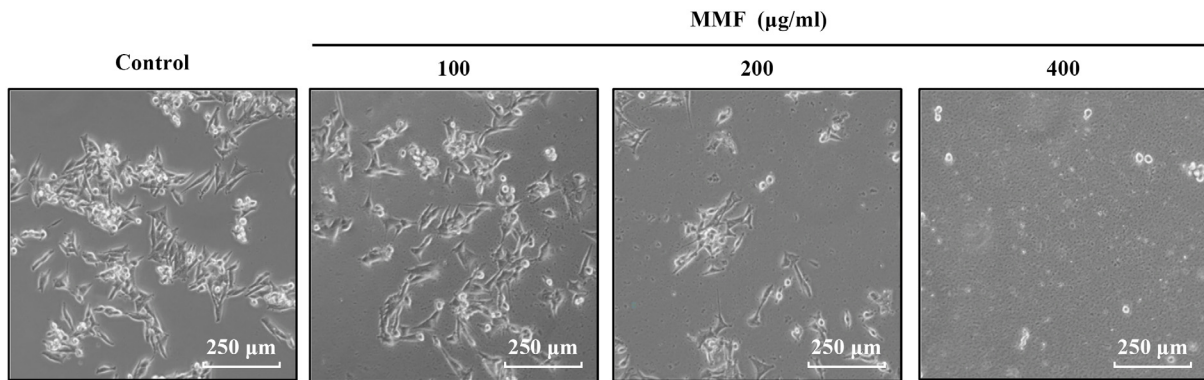


Fig. 2. Effect of MMF on morphological change of human prostate cancer LNCaP cells. Cell morphology was visualized by optical microscopy ( $\times 200$ ). MMF: maesil methanol fraction.

Fig. 3과 같다. MMF를 처리하지 않은 대조군의 경우 세포의 형태가 원형으로 대부분 나타나는 경향을 보였으나, MMF 처리에 따라 100 µg/ml에서는 대조군에 비해 원형의 형태를 잃기 시작하였고 200 및 400 µg/ml의 농도에서는 apoptotic body가 관찰되었다. Kim 등[31]은 탕자나무 미성숙 열매의 추출물이 인체 대장암세포 HCT-116의 사멸을 유도하며 핵의

응축이 발생했다고 보고하였고 Wihadmadyatami 등[53]은 *Ocimum sanctum* 에탄올 추출물이 인체 폐암세포 A549에서 DAPI 염색을 통해 세포수축 및 DNA 단편화를 확인하였으며 축진된 세포사멸을 통해 항암 활성을 제공한다고 보고했다. 따라서, MMF의 처리에 따른 농도의존적인 인체 전립선암세포 LNCaP의 증식억제 효과는 핵의 손상, 응축 및 apoptotic

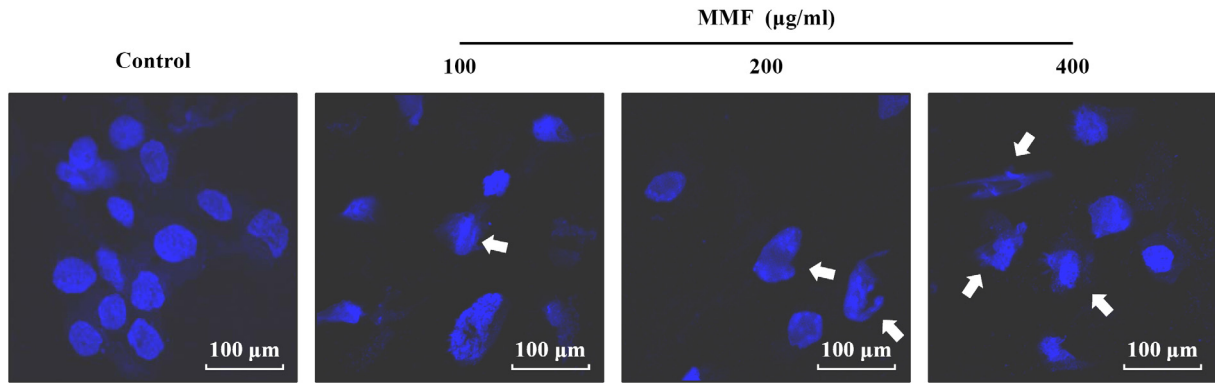


Fig. 3. Effect of MMF on nuclear fragmentation in human prostate cancer LNCaP cells. Cells were stained with 10 μg/ml of Hoechst 33,258 and examined by fluorescence. MMF: maesil methanol fraction.

body의 형성이 일어난 것을 통해 apoptosis와 관련된 것으로 생각된다.

**MMF의 처리가 인체 전립선암세포 LNCaP의 내인성 apoptosis 경로를 통한 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향**

Apoptosis는 mitochondrial pathway인 내인성 경로와 death receptor pathway인 외인성 경로를 통해 발생하며[15], 내인성 apoptosis 경로에서는 apoptosis가 발생할 때, pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현은 농도의존적으로 증가하는 경향을 보이고 있으나, anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2의 발현의 경우에는 감소하는 경향을 띤다[37]. Bcl-2/Bax family의 단백질 발현조절에 의해 mitochondria 막전위가 변화되어 투과성이 증가되면서 cytochrome C 등과 같은 단백질이 mitochondria 외부로 방출된다[8]. 방출된 cytochrome C는 p53 및 caspase와 같은 종양 억제 단백질의 활성을 증가시키고 PARP 단백질의 분절과 함께 apoptosis를 유발하게 된다[41, 55]. MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 apoptosis 관련 단백질에 어떠한 영향을 미치는지 확인한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. MMF의 처리에 따라 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소하고 pro-apoptosis 단백질인 Bax의 발현은 증가하는 것을 확인했다. Apoptosis 경로에서 주요 역할을 담당하는 caspase-3 및 caspase-9의 경우에도 활성이 증가하는 모습을 보이고 있으며 분절된 PARP 또한 발현 정도가 증가하는 경향을 나타내었다. 다른 유사한 연구에서 매실 메탄올 추출물을 통해 혈구암세포 U937에서 미토콘드리아 경로를 통해 apoptosis가 유도되었으며, 매실 추출물의 처리가 흑색종세포인 A375의 2-Id-1 경로를 통해 이루어져 Bcl-2 단백질의 발현을 하향 조절을 통한 apoptosis 유도한다는 연구가 보고된 바 있다[10, 49]. 따라서, 본 결과를 통해 MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 apoptosis 유도 효과는 내인성 apoptosis 경로의 활성화와 관련이 있는 것으로 생각된다.

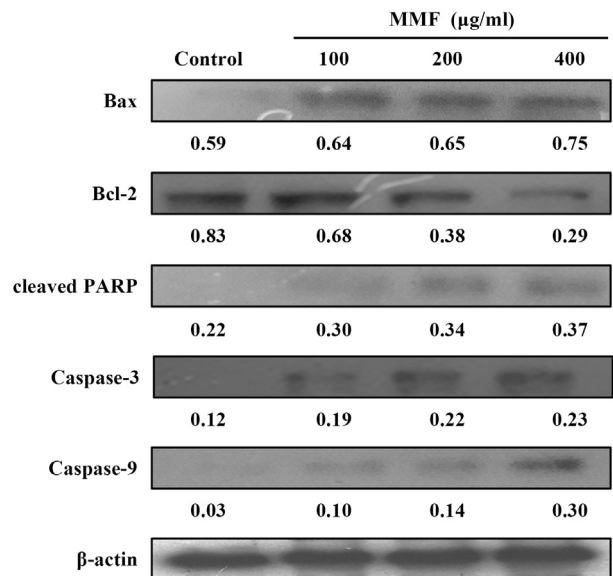


Fig. 4. Effect of MMF on intrinsic apoptosis pathway in human prostate cancer LNCaP cells. Cells were treated with MMF for 24 hr. Bax, Bcl-2, cleaved PARP, caspase-3 and caspase-9 was assessed by Western blot analysis. Cell lysates were subjected to 12% SDS-PAGE. MMF: maesil methanol fraction.

**MMF의 처리가 외인성 apoptosis 경로를 통한 apoptosis에 의한 인체 전립선 암세포 LNCaP의 증식에 미치는 영향**

외인성 apoptosis 경로는 AIF (apoptosis-inducing factor)와 Endo G에 의해 작용한다[17]. AIF는 미토콘드리아 기능과 세포 사멸을 실행에 관여하는 단백질로써 Endo G와 같이 세포 사멸에 관여하는 단백질 핵으로 전위되어 염색체 DNA의 분해에 작용한다[4, 38]. 이에 MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 사멸이 외인성 apoptosis 경로와 관련이 있는지 알아본 결과는 Fig. 5에 나타내었다. AIF inhibitor인 N-PM (N-phenylmaleimide)을 처리하여 인체 전립선암세포 LNCaP에서 MMF의 처리에 따른 성장 억제에 미치는 영향을

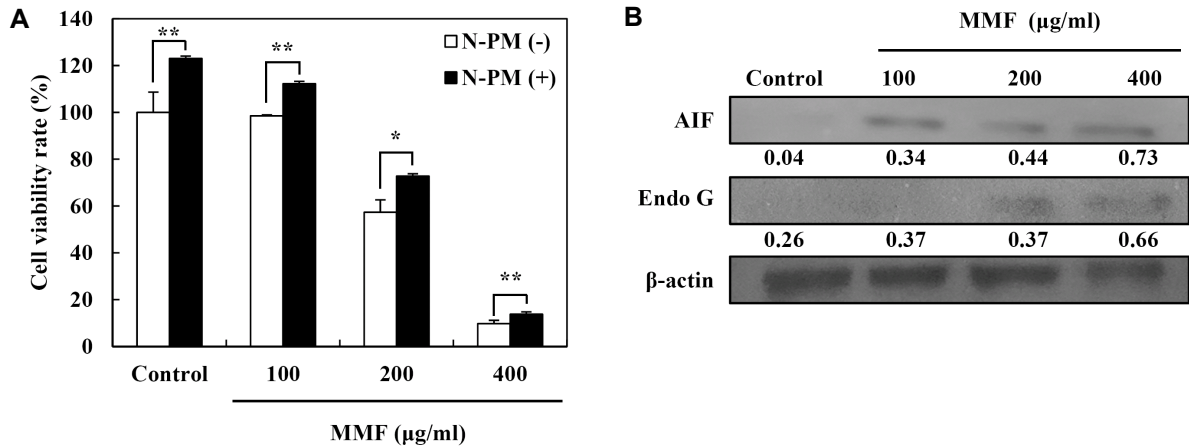


Fig. 5. Effect of MMF on extrinsic apoptosis pathway in human prostate cancer LNCaP cells. (A) The influence of N-PM (AIF inhibitor) was measured by SRB assay. (B) AIF and Endo G was assessed by Western blot analysis. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  by student's *t*-test. Cells were treated with MMF for 24 hr. Cell lysates were subjected to 12% SDS-PAGE. MMF: maesil methanol fraction.

확인한 결과, N-PM을 병용 처리한 군의 경우 MMF를 단독 처리한 군에 비해 유의적으로 생존율이 증가했다(Fig. 5A). 이 결과를 통해 MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 사멸이 외인성 apoptosis 경로와 연관성이 있다고 판단되어 관련 단백질인 AIF와 Endo G 단백질의 발현을 확인하였다(Fig. 5B). MMF를 처리함에 따라 농도의존적으로 AIF와 Endo G 단백질의 ratio 수치를 통해 발현이 증가하는 것으로 나타났

다. 따라서 MMF의 처리는 인체 전립선암세포 LNCaP에서 내인성 apoptosis 경로뿐만 아니라 외인성 apoptosis 경로에도 영향을 미친 것으로 판단되어진다.

**MMF의 처리가 인체 전립선 암세포에서 PI3K/Akt/mTOR 신호경로 관련 단백질 발현에 미치는 영향**

Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) / Akt / mammalian

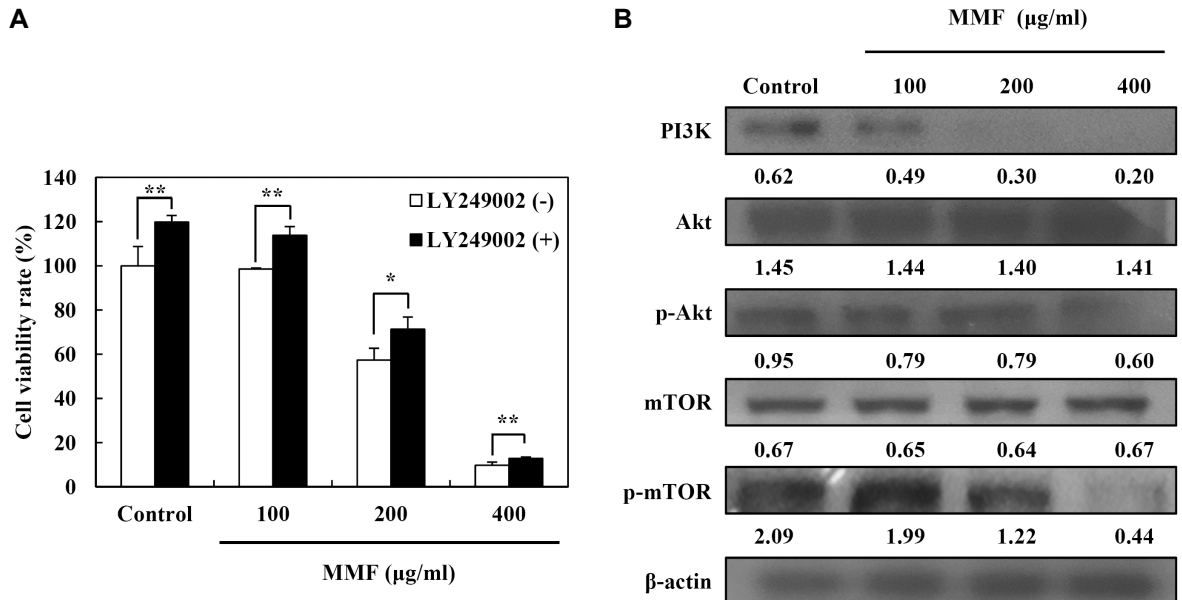


Fig. 6. Effect of MMF on PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer LNCaP cells. (A) The influence of LY294002 (PI3K inhibitor) was determined by SRB assay. (B) PI3K, Akt, p-Akt, mTOR and p-mTOR was assessed by Western blot analysis. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  by student's *t*-test. Cells were treated with MMF for 24 hr. Cell lysates were subjected to 12% SDS-PAGE. MMF: maesil methanol fraction.

target of rapamycin (mTOR) 신호경로의 요소들은 암 발생에 따라 활성화되는 경향을 보이며 Akt와 mTOR는 신호경로의 억제에 발생하면 활성화된 p-Akt와 p-mTOR의 발현이 억제되는 양상을 나타낸다[56]. 중앙 억제에서 치료를 위한 표적을 제공하는 점에서 중요한 관점으로 작용하고 있다[13]. 이에 MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 apoptosis 유도 효과가 PI3K/Akt/mTOR 신호경로에 미친 영향을 알아본 결과는 Fig. 6에 나타내었다. PI3K inhibitor인 LY294002를 처리하여 인체 전립선암세포 LNCaP에서 MMF의 처리에 따른 성장억제에 미치는 영향을 확인한 결과(Fig. 6A), LY294002와 MMF가 병용 처리된 군은 MMF 만을 단독처리한 군에 비하여 증식억제 효과가 유의적으로 감소된 것을 확인했다. 이후 MMF 처리에 따른 LNCaP의 PI3K/Akt/mTOR 신호경로 인자의 발현들을 Western blot을 통해 확인한 결과를 Fig. 6B에 나타내었다. MMF를 처리함에 따라 Akt 및 mTOR의 발현은 변화하지 않았지만 PI3K, p-Akt 및 p-mTOR의 발현이 농도의존적으로 감소하는 것을 확인했다. PI3K/Akt/mTOR 경로의 억제는 암세포의 apoptosis를 유도하며, Gunadharini 등 [14]은 인체 전립선암세포인 PC-3 및 LNCaP에서 ethanolic neem 잎을 이용해 PI3K/Akt 신호경로의 억제 효과를 확인하고 Yang 등[54]은 apigenin의 처리는 PI3K/Akt/mTOR 경로의 억제를 통해 인체 간암세포 HepG2에서 apoptosis의 유도 효과를, Zhang 등[56]은 *Phellodendron amurense*에서 추출한 phellamurin의 처리는 인체 골육종세포 U2OS와 Saos-2의 PI3K/Akt/mTOR 경로 억제를 통한 세포사멸 유도 효과를 보고한 바 있다. 이전 연구 결과를 토대로 MMF의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 억제 효과는 PI3K/Akt/mTOR 신호경로의 조절을 통해 세포의 성장에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

MMF의 처리는 인체 전립선암세포 LNCaP의 내인성 및 외인성 apoptosis 경로의 활성화를 통해 증식을 억제하였을 뿐만 아니라 PI3K/Akt/mTOR 신호경로의 조절을 통해 인체 전립선암세포의 성장을 억제하였다. 결론적으로 이번 연구를 통해 MMF의 천연물 유래 전립선암세포 증식 억제 효능을 통해 매실이 갖는 기능성 소재로서의 활용가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

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

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

1. Abou Baker, D. H. 2020. Achillea millefolium L. ethyl acetate fraction induces apoptosis and cell cycle arrest in human cervical cancer (HeLa) cells. *AOAS* **65**, 42-48.
2. 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. *J. Soc. Kor. Food Sci. Technol.* **32**, 713-719.
3. Bailly, C. 2019. Anticancer properties of *Prunus mume* extracts (Chinese plum, Japanese apricot). *J. Ethnopharmacol.* **10**, 112215.
4. Bano, D. and Prehn, J. H. M. 2018. Apoptosis-inducing Factor (AIF) in *physiology* and disease: The tale of a repented natural born killer. *EBioMed.* **30**, 29-37.
5. Bian, Y., Zeng, H., Tao, H., Huang, L., Du, Z., Wang, J. and Ding, K. 2020. A pectin-like polysaccharide from *Polygala tenuifolia* inhibits pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* by inducing apoptosis and suppressing autophagy. *Int. J. Biol. Macromol.* **162**, 107-115.
6. Chen, C. N., Huang, H. H., Wu, C. L., Lin, P. C., Hsu, J. T., Hsieh, H. P., Chuang, S. E. and Lai, G. M. 2007. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett.* **246**, 237-252.
7. Chen, S., Wang, Y., Xu, M., Zhang, L., Su, Y., Wang, B. and Zhang, X. 2020. miR-1184 regulates the proliferation and apoptosis of colon cancer cells via targeting CSNK2A1. *Mol. Cell Probes.* **53**, 101625.
8. 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.
9. Cho, H. D., Kim, J. H., Won, Y. S., Moon, K. D. and Seo, K. I. 2019. Inhibitory effects of pectinase-treated prunus mume fruit concentrate on colorectal cancer proliferation and angiogenesis of endothelial cells. *J. Food Sci.* **84**, 3284-3295.
10. Chung, Y. J., Park, C., Jeong, Y. K. and Choi, Y. H. 2011. Apoptosis induction by methanol extract of *Prunus mume* fruits in human Leukemia U937 cells. *J. Life Sci.* **21**, 1109-1119.
11. Duriez, P. J. and Shah, G. M. 1997. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 337-349.
12. Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
13. Greenwell, I. B., Ip, A. and Cohen, J. B. 2017. PI3K inhibitors: understanding toxicity mechanisms and management. *Oncology* **31**, 821-828.
14. Gunadharini, D. N., Elumalai, P., Arunkumar, R., Senthilkumar, K. and Arunakaran, J. 2011. Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* **134**, 644-650.

15. Gupta, S. 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* **69**, 2957-2964.
16. Han, J. T., Lee, S. Y., Kim, K. N. and Baek, N. I. 2001. Rutin, antioxidant compound isolated from the fruit of *Prunus mume*. *J. Kor. Soc. Appl. Bio. Chem.* **44**, 35-37.
17. 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.
18. 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.
19. Hwang, W. D., Im, Y. G., Son, B. Y., Park, C., Park, D. I. and Choi, Y. H. 2013. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* in renal cell carcinoma Caki-1 Cells. *J. Life Sci.* **23**, 518-528.
20. Jeong, J. T., Moon, J. H., Park, K. H. and Shin, C. S. 2006. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 2123-2128.
21. Jeong, J. W., Choi, Y. H. and Park, C. 2015. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Cnidium officinale* in human Leukemia U937 cells through activation of AMPK. *J. Life Sci.* **25**, 1255-1264.
22. Jin, Z. and El-Deiry, W. S. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 139-163.
23. Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Oh, C. M., Seo, H. G. and Lee, J. S. 2013. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2013. *Cancer Res. Treat.* **45**, 15-21.
24. Kang, H. I., Kim, J. Y., Cho, H. D., Park, K. W., Kang, J. S. and Seo, Jr. K. 2010. Resveratrol induces apoptosis in primary human prostate cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1119-1125.
25. 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.
26. Kang, S. K., Kang, S. H. and Kim, Y. D. 1999. Studies on the acetic acid fermentation using Maesil juice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 695-700.
27. 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.
28. Kim, J. H., Cho, H. D., Won, Y. S., Heo, J. A., Kim, J. Y., Kim, H. G., Han, S. H., Moon, K. D. and Seo, K. I. 2019. Inhibitory effects of *Prunus mume* solvent fractions on human colon cancer cells. *J. Life Sci.* **29**, 1227-1234.
29. 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.
30. Kim, J. H., Cho, H. D., Won, Y. S., Park, W. L., Min, H. J., Han, S. H., Moon, K. D. and Seo, K. I. 2019. Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activity of solvent fractions from *Prunus mume* ethanol extract. *J. Life Sci.* **29**, 1111-1119.
31. Kim, S. Y., Yi, H. K., Yun, B. T., Lee, D. Y., Hwang, P. H., Park, H. R. and Kim, M. S. 2020. The extract of the immature fruit of *Poncirus trifoliata* induces apoptosis in colorectal cancer cells via mitochondrial autophagy. *Food Sci. Human Wellness* **9**, 237-244.
32. Klotz, L. 2013. Active surveillance for prostate cancer: Overview and update. *Curr. Treat. Options Oncol.* **14**, 97-108.
33. Kwon, H. K., Kim, J. S. and Yoo, H. S. 2009. Review for the current status of cancer complementary and alternative medicine in the world. *J. Kor. Trad. Oncol.* **14**, 1-11.
34. Lee, E. H., Nam, E. S. and Park, S. I. 2002. The effect of Maesil (*Prunus mume*) extract on the acid production and growth of yoghurt starter. *Kor. J. Food Nutr.* **15**, 42-49.
35. Lee, T. H., Paik, J. M. and Hwang, W. I. 1988. Effect of *Prunus Mume* extract on the growth rate of animal Leukemic Cells (L1210, P388) and human colon cancer cells (HRT-18, HCT-48, HT-29). *J. Kor. Uni. Med.* **25**, 365-373.
36. Lim, S. Y., Park, K. Y., Lee, S. H. and Choi, J. S. 2006. Inhibitory effect of methanol extracts and solvent fractions from Meju on mutagenicity and growth of human cancer cells. *J. Life Sci.* **17**, 76-81.
37. Liu, X. and Zhu, X. Z. 1999. Roles of p53, c-Myc, Bcl-2, Bax and caspases in serum deprivation-induced neuronal apoptosis: a possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor. *Neuroreport* **10**, 3087-3091.
38. Loll, B., Gebhardt, M., Wahle, E. and Meinhart, A. 2009. Crystal structure of the EndoG/EndoGI complex: mechanism of EndoG inhibition. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7312-7320.
39. 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.
40. Okada, H. and Mak, T. W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 592-603.
41. Park, J. E., Lee, J. Y., Lee, M. W., Jang, E. J., Hong, C. O. and Kim, K. K. 2018. Isolation and identification of pheophytin, a photosensitizer from nostoc commune that induces apoptosis in Leukemia and cancer cells. *J. Life Sci.* **28**, 1321-1331.
42. Park, J. H., Lee, M. K., Mun, H. C., Choi, G. P., Lee, H. S., Ryu, L. H., Lee, G. Y. and Lee, H. Y. 2004. Cytotoxicity of extracts and fractions from *Echinacea purpurea* L. on human cancer cells. *J. Kor. Medi. Crop Sci.* **12**, 309-314.
43. Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. and Gabai, V. L. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* **283**, 1-16.
44. Qi, W., Zhou, X., Wang, J., Zhang, K., Zhou, Y., Chen, S., Nie, S. and Xie, M. 2020. *Cordyceps sinensis* polysaccharide inhibits colon cancer cells growth by inducing apoptosis and autophagy flux blockage via mTOR signaling. *Carbohydr. Polym.* **237**, 116113.
45. Sheo, H. J., Lee, M. Y. and Chung, D. L. 1990. Effect of *Prunus mume* extract on gastric secretion in rats and carbon tetrachloride induced liver damage of rabbits. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **19**, 21-26.
46. Shi, J., Gong, J., Liu, J., Wu, X. and Zhang, Y. 2009. Antiox-



- idant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT - Food Sci. Technol.* **42**, 477-482.
47. Shin, E. J., Hur, H. J., Sung, M. J., Park, J. H., Yang, H. J., Kim, M. S., Kwon, D. Y. and Hwang, J. T. 2013. Ethanol extract of the *Prunus mume* fruits stimulates glucose uptake by regulating PPAR- $\gamma$  in C2C12 myotubes and ameliorates glucose intolerance and fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *Food Chem.* **141**, 4115-4121.
48. Siegel, R., Miller, K. and Jemal, A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* **65**, 5-29.
49. 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.
50. Uzan, S., Denis, C., Pomi, V. and Varin, C. 1992. Double-blind trial of promegestone (R 5020) and lynestrenol in the treatment of benign breast disease. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **43**, 219-227.
51. Vichai, V. and Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112-1116.
52. Wang, F., Wei, Z. L., Sun, X. R., Zhang, Q., Zhang, C. X., Jiang, W. X., Yan, X., Liu, J. N. and Yuan, X. 2017. Apoptosis inducing factor is involved in stretch-induced apoptosis of Myoblast via a Caspase-9 independent pathway. *J. Cell Biochem.* **118**, 829-838.
53. Wihadmadyatami, H., Karnati, S., Hening, P., Tjahjonod, Y., Fitriana, R., Dwi, M., Kusindartaa, L., Triyonof, T. and Supriatno. 2019. Ethanolic extract *Ocimum sanctum* Linn. induces an apoptosis in human lung adenocarcinoma (A549) cells. *Heliyon* **5**, e02772.
54. Yang, J., Pi, C. and Wang, G. 2018. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **103**, 699-707.
55. 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.
56. Yuan, T. L. and Cantley, L. C. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497-5510.
57. Zhang, H., Jiang, H., Zhang, H., Liu, J., Hu, X. and Chen, L. 2019. Anti-tumor efficacy of phellamurin in osteosarcoma cells: Involvement of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **858**, 172477.

## 초록 : 매실(*Prunus mume*) 메탄올 분획물의 처리에 따른 인체 전립선암세포 LNCaP의 apoptosis 유도 효과

김휘근<sup>1</sup> · 김정호<sup>2</sup> · 허지안<sup>3</sup> · 원영선<sup>3</sup> · 서권일<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>동아대학교 응용생명과학과, <sup>2</sup>경북대학교 식품공학부, <sup>3</sup>동아대학교 식품생명공학과)

본 연구에서는 매실 메탄올 추출물(maesil methanol fraction, MMF)을 제조하여 인체 전립선암세포 LNCaP, RC-58T 및 PC-3에 대한 증식억제 효과를 확인하였다. 인체 전립선암세포인 PC-3 및 RC-58T와 비교해보았을 때, LNCaP은 MMF의 처리에 따른 증식억제 효과가 가장 민감했다. LNCaP의 형태학적 관찰과 apoptotic body 형성을 관찰해보았으며, MMF의 처리로 인한 형태의 변화, 핵 손상 및 응축을 확인했다. MMF의 처리로 인한 인체 전립선암세포 LNCaP에서 성장억제 효과가 내인성 apoptosis 경로와 관련 있는지 확인한 결과, pro-apoptotic 단백질인 Bax, caspase-3, caspase-9, PARP의 발현이 증가하였고, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 감소하는 것을 확인했다. MMF와 AIF inhibitor인 N-phenylmaleimide (N-PM)의 병용처리군에 비해 MMF 단독처리군의 증식억제 효과가 유의적으로 나타났으며 AIF 및 Endo G의 발현 증가를 통해 외인성 apoptosis 경로에 영향을 미치는 것을 확인했다. 또한 PI3K inhibitor인 LY294002와 MMF의 병용처리군에 비해 MMF 단독처리군의 증식억제 효과가 유의적으로 나타났으며 PI3K, p-Akt, p-mTOR의 발현 감소를 통해 PI3K/Akt/mTOR 신호경로에 영향을 미치는 것을 확인했다. 결론적으로 인체 전립선암세포 LNCaP에서 MMF의 증식억제 효과는 천연물 유래 기능성 식품의 소재로서의 가능성을 보여준다.