

당유자 과피 추출물에 의한 HL60 세포의 Apoptosis 유도

현재석¹ · 강성명² · 김아름다슬² · 오명철³ · 오창경³ · 김동우⁴ · 전유진² · 김수현^{5*}

¹제주산업정보대학 식품영양과, ²제주대학교 해양의생명과학부
³제주산업정보대학 관광호텔조리과, ⁴(주)네추럴 F&P 중앙연구소
⁵제주대학교 식품생명공학과

Induction of Apoptosis by *Citrus grandis* Osbeck Peel (CGP) Extract in HL60 Cells

Jae-Seok Hyon¹, Sung-Myung Kang², Areum-Daseul Kim², Myung-Cheol Oh³,
Chang-Kyung Oh³, Dong-Woo Kim⁴, You-Jin Jeon², and Soo-Hyun Kim^{5*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Jeju College of Technology, Jeju 690-714, Korea
²School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea
³Dept. of Tourism Hotel Culinary Art, Jeju College of Technology, Jeju 690-140, Korea
⁴Central Research Center, Natural F&P Co., Ltd., Chungbuk 363-883, Korea
⁵Dept. of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

In the present study, we investigated the anti-proliferation activity of *Citrus grandis* Osbeck peel (CGP) in HL60 (human promyelocytic leukemia) cells. It was found that 80% ethanol extract of CGP could inhibit the cell growth in a dose-dependent manner (250~1,000 µg/mL), which was associated with morphological changes and apoptotic cell death such as depolarized mitochondrial membrane, formation of apoptotic bodies and increased populations of apoptotic sub-G1 phase. The results indicate that CGP extract inhibits the growth of HL60 cancer cells by the induction of apoptosis, which may be mediated by its ability to change the Bcl family proteins and increase the activation of caspase-3 and PARP. Therefore, it is suggested that CGP has the potential to provide a remarkable natural defense against the proliferation of HL60 cells.

Key words: *Citrus grandis* Osbeck peel, anti-proliferation, apoptosis, HL60

서 론

암의 발생 및 암에 의한 사망률이 증가함에 따라 암을 예방하거나 암을 치료할 수 있는 동·식물 및 식품에 대한 관심이 집중되고 있다. 암에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해 매우 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 개발 역시 상당히 진전되어 여러 가지 화학합성 항암제가 임상에서 사용되고 있으나, 독성 및 부작용이 제기됨에 따라 천연물로부터 항암 성분을 찾는 연구가 진행되고 있다(1).

백혈병은 백혈구(white blood cell)를 생산하는 조직인 골수 또는 림프관계에서 발생한 암세포 즉 백혈병세포가 비정상적으로 증식하여 이들이 모든 장기에 침윤하여 다식 증식하는 동시에 말초혈액 중에도 나타나는 병이다. 우리나라의 백혈병은 날로 그 발생빈도가 높아지고 있으며 인구 10,000명당 남성 4명, 여성 3명 정도로 추정되고 있다. 백혈병에는 치료제가 완벽한 것이 없으며 자가골수이식수술을

하더라도 재발 위험이 있으며 동종골수이식은 기증자가 적 으며 치료에 따른 독성이 있다. 항암 화학요법의 경우 구토, 설사, 복통 및 탈모 등 부작용이 심하여 이에 따른 부작용이 적으면서도 치료 효과가 높은 백혈병치료제 개발이 시급한 실정이다. 이와 같이 효과적인 암의 치료와 예방에 있어서 비정상적인 세포나 암세포의 apoptosis 유도는 많은 치료제의 표적이 되고 있으며, apoptosis에 관련된 기전 연구가 많이 진행되고 있다(2-4). 세포의 사멸은 apoptosis와 necrosis로 구분되며, 이것은 세포의 형태학적 및 생화학적 특성에 의하여 구분될 수 있다. Apoptosis는 유전적으로 보존된 관련 유전자에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 세포 죽음과정이다. 이 과정은 형태적으로 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하고, 형성된 사멸체들은 식세포 작용에 의해 제거됨으로써 염증을 유발하지 않는다(5). 반면 괴사(necrosis)는 직접적

*Corresponding author. E-mail: kshyun@jejunu.ac.kr
Phone: 82-64-754-3614, Fax: 82-64-755-3601

으로 독성이 있거나 물리적 상해 등 갑작스런 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정으로 염색사의 불규칙한 응집과 세포질의 팽창과정을 거치게 되고 시간이 지나면 세포막이 파괴되면서 세포가 분해되고 이들은 염증을 유발하게 된다(6). 이에 apoptosis 유도에 의한 세포사멸은 종양이 항암치료에 의해 효과를 나타내는 중요한 기전으로 알려져 있다(7,8).

제주도 재래 감귤류의 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 제주에서 왕귤 또는 땡유지라고 부르는 제주 재래 감귤로서, 분류학상 운향과, 감귤아과에 속하는 과수이며 과피에는 플라보노이드라는 폴리페놀 성분이 많이 함유하고 있다. 플라보노이드는 심장 순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증에 대한 개선 효과가 있다고 보고되고 있으며(9-12), 이에 따른 감귤류 과피 분말 및 과피 추출물은 다양한 기능성에 영향을 주는 우수한 영양성분을 함유하고 있어 의약품 소재 및 기능성식품으로 가능성을 인정받고 있으며 고부가가치 식품으로 이용될 수 있다. 최근 연구를 보면 유자 및 당유자를 이용한 기능성식품 개발 및 생리활성에 대한 연구가 보고되고 있다(13-15).

따라서 이 연구에서는 당유자 과피 추출물의 항암 활성에 관한 기전을 조사하기 위하여 다양한 암세포주를 대상으로 항암활성을 비교하였으며, 그 중 암세포 성장 억제 활성이 뛰어난 혈액암 HL60 세포를 대상으로 apoptosis 유도에 미치는 영향을 조사하였고, 당유자의 기능성식품 소재로서 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출

제주 재래 감귤인 당유자(*Citrus grandis* Osbeck)는 2009년 3월에 채집한 과피를 제주도 서귀포시 대정읍에 있는 금산건강원에서 구입하였다. 당유자 과피 1 kg을 증류수로 세척 후, 습식분쇄기로 분쇄하여 -80°C 에서 냉동 보관한 후 동결건조기를 이용하여 48시간 건조하였다. 건조된 과피 분말 1 g을 80% 에탄올 100 mL에 넣어 상온에서 24시간 추출하였으며 추출 후 membrane filter(0.45 μm , Whatman, Maidstone, England)로 여과하여 사용하였다.

세포 배양

HL60(human promyelocytic leukemia cells), B-16(murine melanoma cells), HT-29(human colon cancer cells), MCF-7(human breast cancer cells) 및 Vero(monkey kidney cells) 세포주를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA) 과 10%의 fetal bovine serum(FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 또는 DMEM 배지(GIBCO,

Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였으며, 계대 배양은 2~3일에 한 번씩 시행하였다.

암세포 증식 억제 효과 측정

4종의 암세포(혈액암: HL60, 피부암: B-16, 대장암: HT-29, 유방암: MCF-7)에 대한 당유자 과피(CGP)의 80% 에탄올 추출물이 암세포 증식 억제 효과와 HL60 암세포에 대한 농도와 시간에 따른 증식억제 효과를 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. 이를 위해 암세포별로 5×10^4 cell/mL의 농도로 세포수를 조정하여 96-well plate의 각 well에 넣고, 시료를 농도별로 첨가하였다. 이를 48시간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 μL (2 mg/mL)을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma) 150 μL 를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(Bio-TEK Instruments, Inc., Winooski Vermont, WI, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 증식억제 정도를 조사하였다.

MTT를 이용한 샘플 독성 측정

CGP 추출물의 세포 독성을 측정하기 위한 방법으로 MTT 분석을 실시하였다. Vero 세포주를 1×10^5 cell/mL로 맞춘 후, 190 μL 씩 96-well plate에 분주하였고 CGP 추출물을 250, 500, 750 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 이를 48시간 37°C incubator에서 배양한 다음, MTT(2 mg/mL) 50 μL 씩 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, DMSO 150 μL 를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. CGP 추출물의 농도에 따른 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포에 대한 샘플 독성 정도를 측정하였다.

미토콘드리아 막 투과성 측정(JC-1 staining)

Apoptosis가 유도되는 과정 중의 하나인 미토콘드리아 막의 투과성을 조사하기 위하여 dual-emission potential-sensitive probe JC-1을 사용하였다. JC-1은 막 전위(membrane potential)에 따라 red와 green fluorescent의 비율은 막의 탈분극 정도를 나타낼 수 있다. 이를 이용하여 공초점 현미경(Laser Scanning Microscope 5 PASCAL program (Carl Zeiss, Jena, Germany))과 BD FACSCalibur™ Flow Cytometry(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 방법을 통하여 CGP 추출물에 대한 HL60 세포의 막 위치에 따른 투과성을 분석하였다.

세포주기 분석

HL60 세포(1×10^5 cell/mL)에 CGP 추출물을 250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$ 로 각각 처리하여 48시간 배양한 후, HL-60 세포를 수확하여 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척하였다. HL60 세포를 4°C에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정시킨 후 PBS로 세척하고, RNase A를 처리한 다음 propidium iodide(PI, Sigma)로 염색하고, flow cytometry로 세포주기를 분석하였다.

염색에 의한 세포핵의 형태 관찰(Hoechst 33342 staining)

24-well plate에 1×10^5 cell/mL로 분주한 후 CGP 추출물을 250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각각 처리하였다. 48시간 배양한 후 Hoechst 33342(Sigma) 10 mg/mL를 각각 1.5 μL 씩 첨가하여 10분 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 이를 형광현미경(IX-70, Olympus optical Co. GmbH, Hamburg, Germany)를 이용하여 세포 형태를 분석하였다.

Western blot 분석에 의한 단백질 발현의 분석

배양을 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (Bovine Serum Albumin)를 표준화하여 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μg 의 lysate를 8~12% mini gel SDS-PAGE(Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF 막(BIO-RAD)에 300 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 막의 blocking은 5% skin milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액을 상온에서 2시간 동안 실시하였다. 단백질 발현량을 검토하기 위한 항체로는 Cell Signaling(Cell Signaling Inc., MA, USA)사의 Bcl-2, Bax, Caspase-3 및 PARP를 사용하였으며, TTBS 용액에서 1:1,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(Amersham Pharmacia Peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech., NY, USA)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech.)과 3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

결과 및 고찰

CGP 추출물의 암세포 증식 억제

감귤의 과피에는 생리활성을 나타내는 많은 성분들이 함유되어 있다고 보고되어 있으며, 대표적으로 naringin, hesperidin, neohesperidin, tangeretin 및 neringenin 등의 플라보노이드가 있다. 이들 플라보노이드 성분들이 항산화, 항염 및 항암 활성을 나타낸다고 보고되어져 있으며(16-18) 특히

당유자 과피에는 naringin, neohesperidin 및 hesperidin이 많이 함유되어 있다(19). 따라서 CGP 추출물의 암세포 증식 억제 활성을 4종의 암세포를 대상으로 MTT 방법을 통하여 측정하였다. Fig. 1의 결과를 보면 CGP 추출물을 250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 48시간을 배양하였을 때 대장암 HT29, 유방암 MCF-7 및 피부암 B16 암세포에서는 40% 미만의 증식 억제 활성을 보였지만 혈액암 HL60 암세포에서는 농도가 증가할수록 세포 증식 억제 활성이 증가하는 경향을 볼 수 있었고, 750 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 60% 이상의 세포 증식 억제 활성을 보였다. 또한 HL60 세포에 CGP 추출물을 처리 시간에 따른 증식 억제 활성을 측정한 결과인 Fig. 2를 보면 24, 48 및 72시간 동안 CGP 추출물을 처리하였을 때 증식 억제 활성이 시간 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며 그리고 농도별로 250, 500, 750 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 처리하였을 때 역시 농도 의존적으로 암세포 증식 억제가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 혈액암 HL60 세포에 CGP 추출물은 농도와 시간 의존적으로 세포 증식을 억제하였는데 이는 이전 연구결과(16,18,19)와 비교하여 보았을 때 CGP 추출물 안에 함유되어진 플라보노이드 성분의 증가에 따른

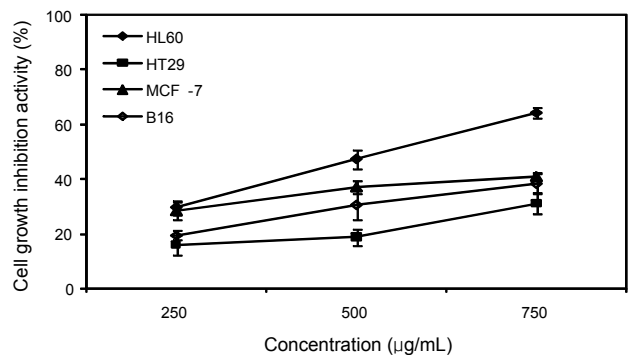


Fig. 1. Inhibitory effects of CGP extract against growth of the tumor cell lines (HL60, HT29, MCF-7, and B16 cells). Cells were treated with different concentrations (250, 500, and 750 $\mu\text{g/mL}$) for 48 hr and measured for cell viability by MTT assay to determine cell growth inhibitory activity.

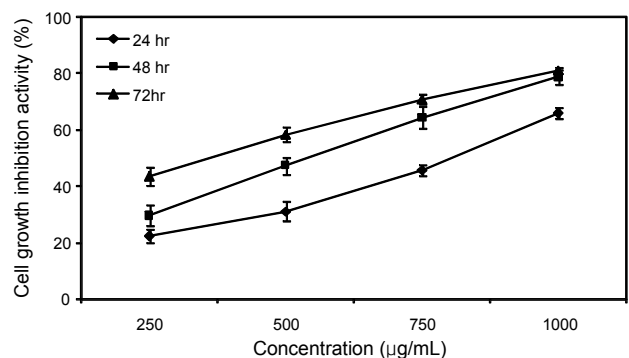


Fig. 2. Inhibitory effect of CGP extract against cell growth of HL60 cells. Cells were treated with various concentration (250, 500, 750, and 1,000 $\mu\text{g/mL}$) of CGP extracts and measured for cell viability by MTT assay at 24, 48, and 72 hr after the CGP extracts treatment.

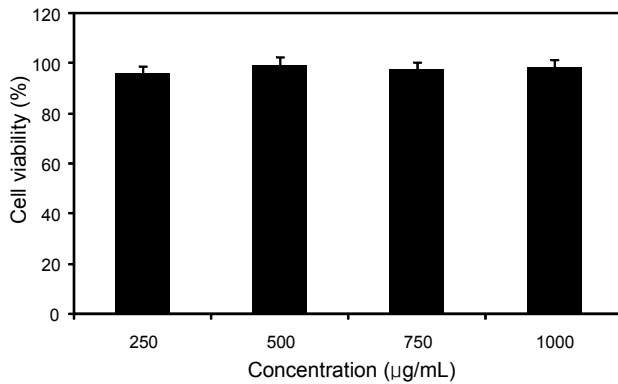


Fig. 3. Cytotoxicity effect of CGP extract on the cell viability of Vero cells. Cells were treated with different concentration (250, 500, 750, and 1,000 µg/mL) for 48 hr and measured for cell viability by MTT assay to determine cytotoxicity of CGP extract.

결과라 사료된다. 따라서 혈액암 HL60 세포를 선정하여 apoptosis 유도 과정을 조사하였다. 그리고 CGP 추출물의 독성을 측정하기 위하여 정상 세포인 Vero 세포에 CGP 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 결과(Fig. 3), CGP 추출물을 처리하지 않은 control을 100%로 하였을 때 모든 농도에서 4% 미만으로 세포 증식을 억제하였기에 CGP 추출물은 정상 세포에 독성이 없다고 사료된다. 위의 결과를 토대로 보면 HL60 세포에 대하여 CGP 추출물이 apoptosis 유도와 연계성이 있을 것으로 예측되어, CGP 추출물이 HL60 세포를 대상으로 apoptosis 유도에 따른 세포의 형태적 변화 및 세포 주기 변화를 관찰하였다.

Apoptosis에 따른 미토콘드리아 막 투과성 변화

J aggregate(JC-1) fluorescence를 이용한 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential)를 측정하였다. JC-1은 미토콘드리아 막에 쉽게 들어갈 수 있는 lipophilic cation dye로서 낮은 막 전위에서는 green-fluorescent monomer(527 nm)상태로 나타나고 미토콘드리아의 전압이 증진된 막 전위에서는 red-fluorescent J aggregate(595 nm)를 형성한다. 세포가 apoptosis가 일어나게 되면 미토콘드리아 막이 탈분극화 되면서 JC-1이 막을 투과하여 녹색을 띠게 된다(20). Fig. 4는 공초점 현미경을 이용하여 측정한 데이터로서 무처리구인 control과 CGP 추출물 750 µg/mL을 처리한 구를 보면 분극화 현상이 나타나는 red dye에서는 control 구의 모든 세포가 염색이 되어 있으나 CGP를 처리한 구는 염색되어진 세포가 거의 나타나지 않았다. 그리고 탈분극화 현상이 나타나는 green dye에서는 CGP를 처리한 구에서만 세포가 전반적으로 염색된 것을 확인할 수 있었다. 이는 CGP 추출물에 의해서 미토콘드리아 막 투과성이 증가하였음을 나타낸다. 막의 투과성 정도를 알아보하고자 flow cytometry 방법을 이용하여 측정하였다. Fig. 5를 보면 CGP 추출물을 250, 500 및 750 µg/mL 농도별로 HL60 세포에 처리하였을 때 무처리구인 control 그룹에서의 FI(fluo-

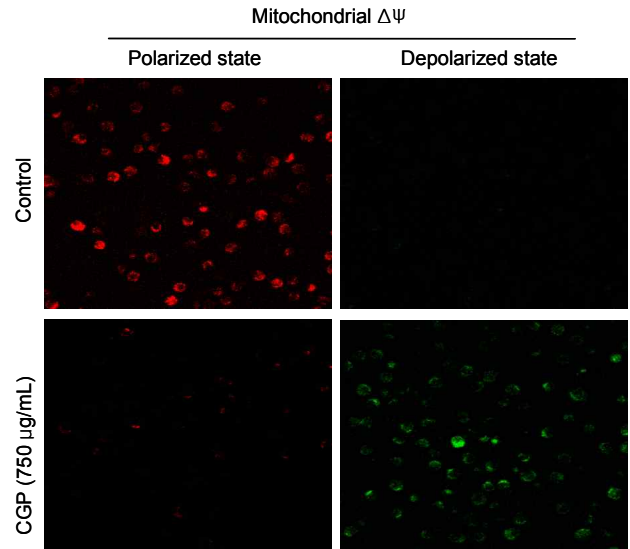


Fig. 4. Representative confocal images illustrate the increase in the green fluorescence intensity of JC-1 by membrane damage in CGP treated HL60 cells as compared to control (original magnification $\times 200$).

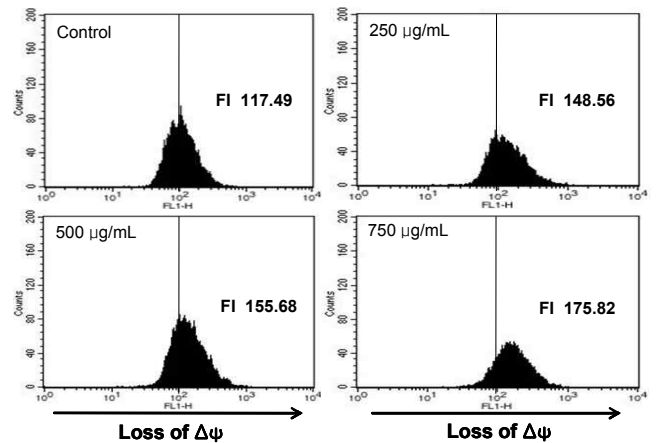


Fig. 5. Fluorescent intensity of membrane potential was detected in CGP treated HL60 cells by flow cytometry after JC-1 staining.

rescence intensity) 값인 117.49보다 증가한 148.56, 155.68 및 175.82로 나타났다. 이는 CGP 추출물의 농도가 증가함에 따라 막의 전위차가 낮아지게 되면서 막 투과성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이로서 CGP 추출물은 HL60 세포의 미토콘드리아 막 투과성을 변화시킴으로서 apoptosis 유도한다는 것을 알 수 있었다.

Apoptosis에 따른 세포 형태 및 주기 변화

Apoptosis 유도 기전에 대하여는 확실하게 증명된 바는 없지만 세포질 내 칼슘치가 증가되어 칼슘 의존성 endo-nuclease가 활성화 되어 핵 내 DNA 분절이 일어나며, trans-glutaminase가 활성화되어 세포질 내 단백질의 cross-linking이 일어나면서 세포질 농축이 일어나고 수액이 세포 밖으로 빠져나가면서 apoptosis body를 형성하는 것으로 알려

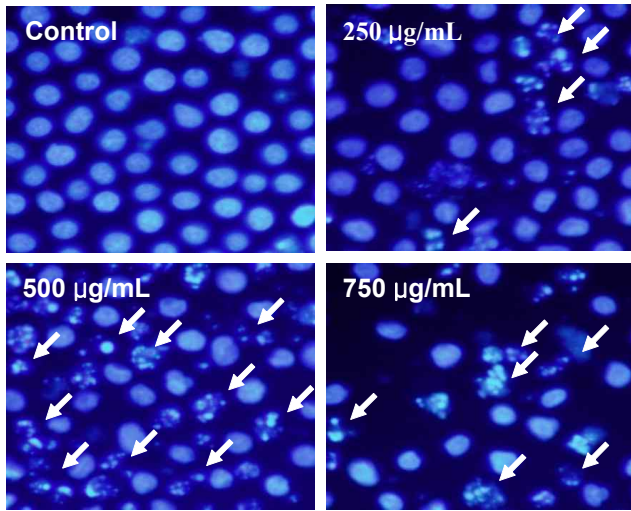


Fig. 6. Apoptotic body formation was observed under a fluorescent microscope after Hoechst 33342 staining and are indicated by arrows (original magnification $\times 400$).

져 있다(21-23). 따라서 CGP 추출물 처리하였을 때 HL60 세포가 apoptosis의 유도에 따른 형태적 변화를 Hoechst 33342를 사용하여 핵을 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다. Fig. 6을 보면 무처리구인 control은 원형의 온전한 핵 모양을 나타내고 있는 반면 CGP 250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 경우에는 농도가 증가할수록 세포 밀도는 감소하였고 더불어 apoptosis 유도 시 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 염색질 응축에 의해 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 처리 농도에 따라 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 CGP에 의한 apoptosis 유도의 정도를 정량적으로 비교하기 위하여 DNA flow cytometry 분석을 이용하였다. 이는 CGP 추출물이 HL60 세포에 apoptosis 유도를 통하여 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는지를 측정하는 방법이다. 즉, DNA에 특이적으로 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI(propidium iodide)로 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 세포 주기를 분석하였고 sub-G1 구간을 세포내 DNA 함량에서 환산하여 apoptotic cell을 백분율로 나타내었다. 그 결과, Fig. 7을 보면 무처리구인 control은 2.3% 정도의 sub-G1 함량을 나타내었으나 CGP 250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리하였을 경우 28.4, 38.4 및 49.9%로 sub-G1 함량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 CGP 추출물에 의한 HL60 세포의 형태와 주기의 변화는 apoptosis 유도와 연관이 있음을 알 수 있었다.

Apoptosis 관련 단백질의 발현 변화

이전 결과에서 확인된 CGP 처리에 따른 HL60 세포의 apoptosis 유도에 관여하는 기전의 해석을 위하여 Bcl-2 family, caspase 및 PARP의 발현 변화를 western blot을 통하여 조사하였다.

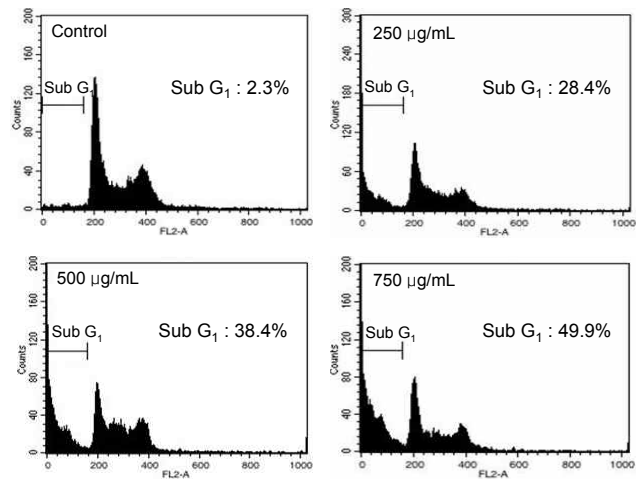


Fig. 7. Apoptotic sub-G1 content was detected by flow cytometry after propidium iodide staining.

Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 단백질로, 미토콘드리아 막에 존재하거나 세포 사멸유도 신호에 의해 미토콘드리아 막으로 이동하여 세포사멸을 조절하는 중요한 조절인자이다. Bcl-2 family 단백질은 아미노산 서열의 유사성과 단백질의 기능에 따라 anti-apoptotic 단백질과 pro-apoptotic 단백질 등으로 나뉜다(24). Pro-apoptotic 단백질은 미토콘드리아 막 바깥쪽으로 이동하여 막 투과성을 증가시킴으로써 cytochrome c의 방출을 촉진하여 세포사멸을 유도하고, 반면 anti-apoptotic 단백질은 미토콘드리아의 막의 탈분극을 억제하여 세포사멸을 억제한다고 보고되었다(25). HL60 세포에 CGP를 처리하였을 때 막 투과성에 의한 apoptosis 유도가 일어나는지 단백질 발현을 통하여 확인해본 결과, Fig. 8을 보면 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현은 CGP를 농도별로 처리하였을 때 무처리구에 비하여 농도 의존적으로 감소하였으며 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 경우 무처리구에 비하여 CGP 농도가 증가함(250, 500 및 750 $\mu\text{g/mL}$)에 따라 확연히 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 막 전위차에(JC-1 staining) 따른

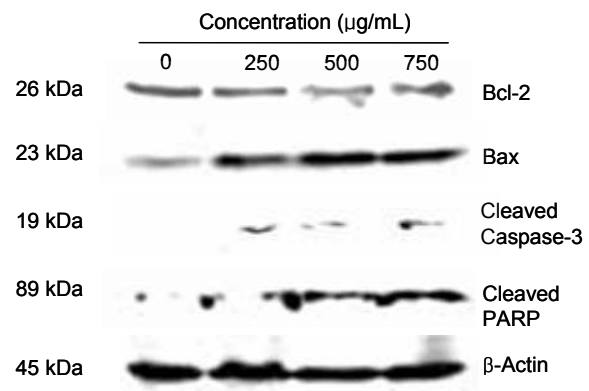


Fig. 8. Effect of CGP extract on apoptosis-related proteins in HL60 cells by western blot analysis.

confocal image와 flow cytometry 결과가 일치하는 것으로 보아 막의 투과성 변화로 인한 apoptosis의 유도가 일어났으리라 사료된다. 그리고 세포의 apoptosis의 다양한 기전 중 하나인 caspase activation은 세포 내 단백질이 caspase에 의해 분해되면서 신호가 전달되는 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포사멸에 관여하며 caspase 활성을 통해 세포사멸의 정도를 파악할 수 있다(26). 또한 caspase의 활성화에 동반된 apoptosis가 유도되었을 때 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질 중 poly (ADP-ribose) polymerase(PARP) 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 활성화된 caspase-3에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 기능이 상실하게 되며, 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편의 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다고 보고되었다(27). Fig. 8을 보면 cleaved caspase-3의 단백질 발현량이 CGP를 농도별로 처리하였을 때 무처리구에 비하여 농도 의존적으로 증가하진 않았으나 발현되었다는 것을 알 수 있었으며 또한 caspase-3에 의해 활성화된 cleaved PARP 형태의 단백질 역시 농도 의존적으로 발현량이 증가하는 것을 알 수 있었다.

위의 결과를 보면 CGP 추출물은 HL60 세포에서 apoptosis를 유도한다는 것을 알 수 있었다. 세포의 증식을 억제하고 apoptosis의 유도 단계인 막 전위의 탈분극 현상으로 인한 투과성 증가, apoptosis의 전형적 형태를 띠는 apoptotic body 생성 및 DNA-hypodiploid 상태인 sub-G1의 생성을 확인하였고 western blot을 통하여 CGP 추출물이 HL60 세포를 apoptosis를 유도하여 증식을 억제하는 기전을 확인할 수 있었다. 이렇게 CGP가 HL60 세포를 apoptosis 유도를 통한 증식을 억제할 수 있는 요인은 플라보노이드라고 사료된다. 이전 연구에서 보면 CGP에는 많은 플라보노이드가 함유되어 있다고 보고되어 있으며(15,19) 본 연구자도 전 연구에서 LC/MS를 통하여 CGP의 플라보노이드를 분석하였다. CGP에는 neohesperidin, naringin, hesperidin, tangeretin, nobiletin 등 수십 종의 플라보노이드를 함유하고 있었다. 이런 플라보노이드는 폴리페놀계의 하나의 큰 그룹으로서 우리가 소비하는 과일과 채소에 많이 함유되어 있다고 알려져 있으며 최근 연구 결과를 보면, 플라보노이드가 항산화, 항염, 항균 및 항암 등의 생리활성이 있다고 보고되고 있다(9-12). 그리고 플라보노이드 한 성분인 naringin의 경우 당유자와 감귤류에 많이 함유된 성분으로서 보고되어 왔고 이를 이용한 항암 연구를 보면 mouse leukemia P388 세포에서 apoptosis를 유도하여 세포 증식을 억제하였다고 보고되었으며 naringin의 비당체 형태인 naringenin도 유방암 세포인 MDA-MB-231과 대장암 세포인 Caco-2에서 DNA-hypodiploid 생성을 유도하여 세포 증식을 억제하였다(28). 또한 hesperidin도 유방암 세포인 MCF-7과 전립선

암인 PC-3에서도 androgen의 조절 작용에 따른 세포 증식을 억제하였고(29), 그 외에도 tangeretin이 혈액암 HL60 세포에서, nobiletin이 신경아세포종 SH-SY5Y에서 각각 apoptosis를 유도하여 세포 증식을 억제한다고 보고되었다(30,31). 이렇게 플라보노이드는 세포내나 분자 범위의 넓은 범위에서 작용하여 항종양과 암세포 증식 억제 활성화에 영향을 나타내었다. 암세포의 증식을 억제하기 위한 세포내 대사의 조절 인자로서 보면 세포 형태와 주기를 변화시킴으로써 세포의 apoptosis를 유도하거나(32,33) 혹은 분자 범위에서는 플라보노이드가 receptor, enzymes 및 kinases에서 상호 작용 통하여 증식 억제를 유도하였다(34-36).

위 결과와 이전 연구를 토대로 보면 당유자 과피(CGP) 추출물에 함유되어진 플라보노이드는 HL60 혈액암 세포에서 apoptosis를 유도하여 세포 증식을 효과적으로 억제하였기에 항암과 관련되어진 기능성식품 및 소재 개발 원료로서 이용 가능성이 높다고 판단된다.

요 약

당유자 과피(GGP) 80% 에탄올 추출물을 4종의 암세포에 (피부암, 대장암, 유방암 및 혈액암) 처리하여 증식 억제 활성을 측정된 결과, 혈액암 HL60 세포에서 높은 증식 억제 활성을 보였다. 이에 CGP 추출물이 HL60 세포에 대한 apoptosis 유도에 따른 세포 증식 억제 활성을 조사하였다. Apoptosis 유도의 첫 단계인 막 투과성을 측정된 결과, confocal image와 flow cytometry에서 CGP를 처리하였을 때 탈분극 현상에 따른 막 투과성이 증가하였고 세포내 핵을 hoechst 33342를 이용하여 염색하였을 때 apoptosis가 일어났을 때 나타나는 전형적인 형태의 apoptotic body가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 flow cytometry를 통하여 세포 주기를 측정하였을 때 DNA-hypodiploid 형태의 sub-G1가 CGP 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Apoptosis 유도 기전을 western blot으로 측정된 결과를 보면, CGP 추출물을 혈액암 HL60 세포에 처리하였을 때 Bcl family의 anti-apoptotic Bcl-2 단백질의 감소와 pro-apoptotic Bax 단백질의 증가로 인하여 하위 기전인 caspase-3가 활성화되었으며, 이 활성화로 인하여 apoptosis 유도에 직접적으로 관여하는 PARP 단백질을 활성화시키면서 apoptosis를 유도하였다. 따라서 당유자 과피는 항암과 관련되어진 기능성식품 및 소재 개발 원료로서 개발이 가능하리라고 사료된다.

문 헌

1. Doll R, Peto R. 1981. The cause of cancer, quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1191-1308.
2. Barisic K, Petrik J, Rumora L. 2003. Biochemistry of apop-

- otic cell death. *Acta Pharm* 53: 151-164.
3. Frankfurt OS, Krishan A. 2003. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cell. *Anticancer Drug* 14: 555-561.
 4. Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495.
 5. Clarke PG, Clarke S. 1995. Historic apoptosis. *Nature* 378: 230.
 6. Robaye B, mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. 1991. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells *in vitro*. *Am J Pathol* 138: 447-453.
 7. Chresta CM, Arriola EL, Hickman JA. 1996. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Behring Inst Mitt* 97: 232-240.
 8. Kim KN, Kim SB, Yoon WJ, Yang KS, Park SY. 2008. Induction of apoptosis by *Scolopendra subspinipes mutilans* in human leukemia HL-60 cells through Bcl-xL regulation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1408-1414.
 9. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Jeong TS, Choi MS. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA:cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* 29: 1182-1185.
 10. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. 1990. Flavonoids as superoxide scavenger and antioxidants. *Free Rad Biol Med* 9: 19-21.
 11. Cook NC, Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-76.
 12. Damon P, Flandre O, Michel F, Perdrix L, Lavrid C, Crastes de Paulet A. 1987. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. *Arzneimittelforschung* 37: 1149-1153.
 13. Kim YJ, Moon JY, Kim JH, Kim HG, Kim JH, Cho SK. 2007. Effects of mixing method and storage period of *Dangyuja*-sugar mixture on customer preferences for *Dangyuja*-tea. *Kor J Food Preserv* 14: 160-164.
 14. Lee HJ, Kang GJ, Yoon WJ, Kang HK, Kim YS, Kim SM, Yoo ES. 2006. Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW264.7 and HaCat cells. *Kor J Pharmacogn* 37: 74-80.
 15. Lim HK, Yoo ES, Moon JY, Jeon YJ, Cho SK. 2006. Antioxidant activity of extracts from *Dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) fruits produced in Jeju island. *Food Sci Biotechnol* 15: 312-316.
 16. Kanno Si, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K, Ishikawa M. 2005. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull* 28: 527-530.
 17. Kamaraj S, Ramakrishnan G, Anadakumar P, Jagan S, Devaki T. 2009. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Invert New Drugs* 27: 214-222.
 18. Karen LM, Peter JF, James K. 2007. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Letters* 251: 168-178.
 19. Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 462-469.
 20. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, Chung WY, Park KK, Park JH. 2006. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 17: 689-696.
 21. Wyllie AH. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 11: 95-103.
 22. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M. 1991. Apoptosis: molecular mechanisms in the programmed of cell death. *Eur J Cell Biol* 56: 170-177.
 23. Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E, Piacentini M. 1989. Apoptosis hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 245: 150-154.
 24. Cory S, Huang DC, Adams JM. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.
 25. Koesmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an antioxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4: 327-332.
 26. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. 2005. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull Cancer* 92: 219-226.
 27. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53: 3976-3985.
 28. Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K, Ishikawa M. 2005. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull* 28: 527-530.
 29. Lee CJ, Leslie W, Mary AJ, Vy N, Jessica T, Gregory S. 2009. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phytother Res* [Epub ahead of print].
 30. Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K. 1995. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Brit J Cancer* 72: 1380-1388.
 31. Yukihiro A, Tomohiro I, Kenji O, Munekazu I, Yoshinori N. 2008. Interactive effects of polymethoxy flavones from citrus on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Bioorg Med Chem* 16: 2803-2810.
 32. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cell lines. *Eur J Nutr* 38: 133-142.
 33. Agarwal R. 2000. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol* 60: 1051-1059.
 34. Collins-Burow BM, Burow ME, Duong BN, MxLachlan JA. 2000. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms. *Nutr Cancer* 38: 229-244.
 35. Jacobson KA, Moro S, Manthey JA, West PL, Ji XD. 2002. Interactions of flavones and other phytochemicals with adenosine receptors. *Adv Exp Med Biol* 505: 163-171.
 36. Gamet-Payrastra L, Manenti S, Gratacap MP, Tullieux J, Chap H, Payrastra B. 1999. Flavonoids and the inhibition of Pkc and Pi 3-kinase. *Gen Pharmacol* 32: 279-286.