

복분자의 유방암 세포 사멸 및 사멸 유전자 발현 유도 효과

김희정·강금지*

덕성여자대학교 자연과학대학 식품영양학과

Inducing Effects of *Rubus coreanus* on Cell Death and Apoptotic Gene Expressions in Human Breast Cancer Cells

Hee-Jung Kim and Keum-Jee Kang[†]

Dept. of Food & Nutrition, College of Natural Science, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

We investigated the inducing effects of *Rubus coreanus* extract (RCE) on apoptosis and its related gene expressions in human breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were cultured in the presence of 0, 200, 300, and 400 $\mu\text{g/mL}$ RCE for 24h. MTT assay demonstrated that relative cell viability measured a decrease in a dose-dependent manner ($p<0.05$). This dependency was also found in the increasing levels of cell death by a dual staining with Hoechst 33322 and propidium iodide ($p<0.05$). These close associations was also observed by different stages of apoptotic processes, as shown by an Apoptosis Detection Kit. To determine whether the alterations in such cell activities obtained above cause the induction of apoptotic genes, RT-PCR was performed expressions of both Bcl-2 and Bax mRNAs. The Bcl-2/Bax ratio which is an important indicator of apoptosis, was found to have significantly decreased dose dependence ($p<0.05$). Western blot analysis also demonstrated that Caspase-3 significantly increases in a dose-dependent manner ($p<0.05$) in addition to similar alterations of other proteins examined. Taken these results together, the ethanolic RCE used induces a reduction in cell viability along with increased membrane permeability. This leads to a pre-cautious apoptotic process and, subsequently, cell death through the apoptotic pathway involving Bax and Caspase-3 in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

Key words: *Rubus coreanus*, MDA-MB-231 cell, viability, permeability, mRNAs, proteins, apoptosis.

서론

세포의 성장과 분열에는 G1, S 및 G2/M기로 나뉘는 세포주기가 존재하는데, 다양한 원인에 의하여 세포주기 능력을 상실한 비정상적인 세포를 암이라고 한다(Kastan & Bartek 2004). 암 발생은 여러 가지 원인 인자들의 복합적 작용에 의해 발생하는데, 유방암의 경우, 식이섭취에 따라 세포분자 경로에 가장 영향을 미친다고 연구되어 있다(Pierce *et al* 2007). 여성의 건강에 크게 영향을 미치며, 사망률이 높은 유방암은 동서양을 막론하고 빠른 속도로 증가하고 있는 추세이다(American Cancer Society 2013, Ministry of Health and Welfare 2012).

현재 항암제들은 종류에 따라 효능이 다를 뿐만 아니라, 정상세포의 손상 및 면역력 저하 등 치료 후의 경과나 부작용에서 많은 문제점을 가지고 있기 때문에(Zhou & Zhong 2004), 치료 효능이 뛰어나면서 부작용이 거의 없는 천연물이 관심

을 받고 있다. 이러한 필요에 의해서 최근 천연물들이 관심을 받게 되었고, 일부 천연물에서 항암 및 면역 조절 효과가 뛰어나다는 연구 결과들이 밝혀지고 있다(Navindra & Seeram 2008). 이와 관련하여 이소플라본이 환경호르몬인 estradiol과 에스트로겐의 결합을 방해함으로써 유방암 유전자의 발현을 저해하고 있다는 보고(Chen *et al* 2003)뿐만 아니라, 강황의 추출물 성분인 curcumin은 증식 중인 암세포의 다양한 신호 전달계를 통하여 암세포의 유전자 발현을 억제(Liu & Chen 2013)한다는 보고들을 통하여 천연물 추출물이 유방암의 예방과 치료에 유효한 물질인 것으로 생각된다.

장미과(Rosaceae family), 산딸기 속(*Rubus*)에 속하는 복분자는 flavonoid, gallic acid, protocatechuic acid, triterpenosieds, tannins, catechin 등 폴리페놀 화합물이 풍부하다(Park *et al* 2008, Jakobek *et al* 2011). Berry류에 들어있는 폴리페놀이 생물학적 대사에 직접적인 영향을 주며, 뛰어난 항산화 기능을 가진다고 보고되어 있다(Ju *et al* 2009). 특히 black raspberry, blueberry, strawberry 등의 구성성분은 잠재적 항산화, 항암 가치가 높다고 평가하였으며(Seeram & Herber 2007), Boivin *et al*(2007) 연구에 의하면 berry류(strawberry, raspberry,

[†] Corresponding author : Keum Jee Kang, Tel: +82-2-901-8363, Fax: +82-2-901-8372, E-mail: kjkang@duksung.ac.kr

blackberry)는 각각 위암, 췌장암, 소장암, 유방암 등 항암 효과가 있다는 사실이 발견되었다.

Kim *et al*(2005) 연구에 따르면 HT-29 대장암세포에 복분자 추출물을 첨가하였을 때 세포 사멸 효과를 관찰할 수 있었으며, 전립선암에서도 이와 유사한 항암 효과를 관찰할 수 있었다(Kim *et al* 2012b). Coates *et al*(2007)의 연구에 따르면 대장암세포인 HT-115, Caco-2에 raspberry 추출물을 첨가하여 배양하였더니 암과 같은 만성적 질병에 높은 효능을 보인 것으로 보고되었다. 또한 Ravoori *et al*(2012) 연구는 12주 정도 종양이 발병된 쥐 그룹에게 복분자와 blueberry를 2.5% 비율의 보충제로 섭취한 결과, 유방암 발현이 조절되어 항암 효과가 있는 것으로 보고되었다.

최근 복분자 연구는 지질 대사 개선(Bhandary *et al* 2012), 항염증 효과(Yang *et al* 2008), 항 알러지 효과(Kim *et al* 2012a), 당뇨병 골다공증 완화(Choi *et al* 2012), 항산화 활성 증대(Yoon *et al* 2001), 피로감 회복 효과(Jung *et al* 2007), 호르몬 분비 촉진(Beak *et al* 2004) 등 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있다. 이처럼 복분자의 생리 활성 물질들과 관련하여 다양한 선행 연구가 보고되고 있지만, 복분자 추출물을 이용하여 유방암 세포에 대한 세포화학적 분석을 이용한 항암 효과에 대한 연구는 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 천연 물질인 복분자 에탄올 추출물로부터 인체유방암 MDA-MB-231 세포의 활성, 막투과성, 세포 사멸 유형 및 사멸 진행 과정 등을 세포화학적 기법을 통해 검증하고, apoptosis 기전에 관여하는 유전자를 mRNA (Bcl-2, Bax)와 단백질(p53, Bcl-2, Bax, Caspase-3) 수준에서 분석을 통하여 복분자의 천연 항암 물질로서의 기능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

본 실험에 사용한 복분자는 2011년도 7월경에 전북 고창군 고창읍 신월리산 고창 농장으로부터 완숙한 생 과육을 구입하여 사용하였다. 복분자 과육 80 g을 800 mL의 70% ethyl alcohol(EtOH)을 첨가하여 80°C water bath에서 3시간 동안 환류 추출하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 추출된 용액은 Whatman No. 1 disc paper(VWR International Ltd, Leicestershire, UK)를 사용하여 여과하였다. 그 후 추출액을 rotary vacuum evaporator(Eyela N-1000, Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후, 동결 건조(OPR-FDU-9603, Operon Co., Ltd, Gyeonggido, Korea)하여 분말 시료를 얻었다. 이렇게 얻은 분말 시료는 30% EtOH에 녹여, 여과하여 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

본 실험의 인체 유방암 MDA-MB-231 세포주는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, high glucose, Gibco, Life Technologies)에 10% fetal bovine serum (Welgene, Daegu, Korea), 1% penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 혼합하여 만든 배지를 사용하여 5% CO₂의 37°C 배양기(MCO-15AC, Sanyo Electric Co., Ltd, Japan)에서 배양하였다. 세포 농도가 1×10^6 /mL로 계대하였고, 세포가 배양 접시의 70~80% 정도 증식한 경우, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 0.025% trypsin과 0.01% ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)로 제조된 trypsin- EDTA(T/E) 용액을 이용하여 단일 세포로 분산 후, 혈청이 포함된 배양액을 첨가하여 반응을 중지시키고, PBS로 3회 수세하여 계대 배양하여 유지하였다.

3. 시료 첨가

유방암 MDA-MB-231 세포에 대한 *Rubus coreanus* extract (RCE)의 효과를 검토하기 위하여 균일하게 제조, 소량으로 분주된 시료를 용해시킨 후, 처리군의 각 배양접시의 세포에 이용되는 배양액의 부피에 해당하는 용액을 미리 tube에 담아 이용될 최종 농도의 RCE를 첨가하여 잘 혼합하였다. 그런 다음 12,000 rpm에서 10분 원심분리 후, 상정액만을 회수하여 세포 배양액을 배양접시에서 제거한 후, 각각 첨가함으로써 배양액에서 형성되는 입자 및 응집물과 직접적인 첨가로 인한 세포 손상을 피하였다. 무처리 대조군(0 µg/mL RCE) 및 용매인 30% 에탄올군(0 µg/mL RCE)도 만들어 용매로 인한 세포 활성을 평가하기 위하여 유사한 방식으로 동일 과정을 수행하였다.

4. MTT 분석

RCE 처리에 따른 MDA-MB-231 세포의 활성을 결정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 먼저 배양된 MDA-MB-231 세포를 96-well plate에 1×10^4 /well의 밀도로 분주하여 안정될 때까지 24시간 배양한 후, RCE의 최종 농도가 각 0, 200, 300 및 400 µg/mL가 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 well에 동량의 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 각 well에 첨가하였다. 37°C의 세포 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, dimethyl sulfoxide(DMSO)를 100 µL씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시켜, ELISA reader(Soft Max, M2, Bio-Rad Laboratories Inc, USA)로 570 nm에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 측정된 결과인 세포 활성은 비교를 위하여 각 처리군의 OD 값을 대조군의 OD 값에 대한 백분율로 나타내었다. 이를 바탕으로 흡광도를 50%로 감소시

킬 수 있는 시료의 농도(IC₅₀, half maximal inhibitory concentration)와 앞으로 수행될 실험에 사용될 농도를 산출하였다.

5. Hoechst 33342와 Propidium Iodide(PI) 이중 염색

RCE 처리에 의한 세포 사멸, 증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여, Hoechst 33322(Hoechst, Sigma, USA)와 PI(Sigma)를 이용하여 이중염색하였다. 간단히 세포를 24-well plate에 RCE를 농도별 처리 종료 후 상정액을 제거하고, PBS로 세포단층을 조심스럽게 하여 부유 세포를 제거되지 않도록 단계적으로 수세하였다. Hoechst와 PI를 각각 10 및 5 µg/mL의 농도로 첨가하여 어두운 곳에서 20분간 반응시킨 후, 형광 현미경으로 영상을 기록하였다. 이를 기초로 세포수를 계상하여 전체 세포 수에 대한 PI 염색 세포수의 비율로 세포 사멸을 나타내었다.

6. 사멸 세포의 유형 및 사멸 과정 분석

RCE 첨가 농도에 따른 세포 사멸의 유형과 사멸 단계를 보다 정확하게 분석하여 농도별 일어나는 세포 사멸의 특성을 결정하기 위하여 세포막의 막투과성을 탐지함으로써 세포의 사멸 진행 과정을 차별화할 수 있는 Cell Lab ApoScreen Annexin V-FITC Apoptosis Kit(Beckman Coulter, Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 세포를 6-well plate에 3×10^5 /well의 농도로 분주하여 24시간 동안 안정시킨 후, RCE를 농도별로 처리, 24시간 배양 후 T/E를 처리, 원심 분리하여 세포들을 회수하였다. 그 후 각각의 농도별 세포의 수를 정량하여 $1 \times$ binding buffer를 첨가하여 총 세포수를 일정하게 맞추고, 각 농도별 세포에 annexin V-FITC 용액 5 µL와 PI 용액 5 µL를 첨가하여 어두운 곳에서 15분 동안 반응시킨 뒤, FACS analysis 기기(Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter, Chicago, IL, USA)를 이용하여 각 세포 사멸 유형 및 단계별 사멸 세포를 분석하였다.

7. RT-PCR 분석

세포 증식억제 및 사멸 유도에 관여하는 유전자가 mRNA 수준에서도 영향을 주는지 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. RCE 농도별로 처리한 MDA-MB-231 세포로부터 RNA를 분리하고, 정량한 RNA량 1 ng/nL가 되도록 DEPC-treated water(DEPC-water)를 첨가하였다. 준비한 시료는 DNase 처리 과정을 거쳐 cDNA 합성을 위하여 역전사 반응을 수행하였다. 이는 각 처리군 별 RNA에 cDNA 합성 mix(10× RT buffer 2 µL, 25 mM MgCl₂ 4 µL, 10 mM dNTP 2 µL, oligo dT 1 µL, AMV RTase 0.75 µL, RNase inhibitor 0.5 µL, DEPC-DW 4.75 µL)를 첨가한 후, 42°C 60분, 95°C에서 5분 반응시켰으며, 이후 -20°C에 저장하였다.

표적 유전자를 증폭하기 위하여 저장된 cDNA 시료에 10× PCR buffer 5 µL, 25 mM MgCl₂ 3 µL, 25 mM dNTP mix 5 µL, Taq DNA polymerase 0.2 µL(Invitrogen, Life Technologies Co., The Netherlands)와 각 유전자의 primer 쌍들(Table 1)을 넣고, DEPC-water를 혼합하여 총 용액이 50 µL로 만들어 준 뒤, RT-PCR(Bio-Rad Life Science, USA) cycle을 실행하였다. 이어서 1.5% agarose gel로 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색된 gel 상의 유전자 발현 정도를 Gel Documentation System(Gel Doc™ XR+, Bio-Rad Life Science, USA)으로 시각화하여 밴드를 관찰하고 영상 기록을 하였다.

8. Western Blot 분석

RCE가 처리된 유방암 세포의 생존과 사멸에 관여하는 단백질의 발현을 조사하기 위하여 Western blot 분석을 하였다. MDA-MB-231 세포를 1×10^6 /well의 양으로 분주하고, RCE를 농도별로 24시간 처리한 후 세포를 회수하고, 각 처리군 별 세포들은 RIPA buffer(pH 7.4, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycerol)를 이용하여 세포를 용해시켰다. 각 세포 용해 시료를 SDS-PAGE gel에 단백질 크기별로 분리한 후, nitrocellulose membrane에 전기적으로 전이시킨 후, 전이가 끝난 membrane은 5% skim milk/TBST(1.5 M NaCl, 100 mM Tris base, pH 7.4, 1% Tween 20)로 실온에서 1시간 blocking한 후, β-Actin, p53, Bcl-2, Bax 및 Caspase-3(Santa Cruz Biotechnology, USA)의 1차 항체를 이용하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 그리고 TBST로 세척한 후, 2차 항체 goat anti-rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, USA)로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 ECL Western Blotting Detection Reagents(RPN 2108, GE Healthcare Life Sciences, USA)를 이용하여 반응시켜, 그 결과를 Gel Documentation System(Bio-Rad Life Science)으로 관찰하여 영상을 기록하고, 분자량을 비교, 분석하였다.

9. 통계 분석

Table 1. Gene primer pairs and their DNA sequences used for PCR

Genes	Sequences of the primer pairs	Product sizes(bp)
β-Actin	Forward 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3'	564
	Reverse 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'	
Bcl-2	Forward 5'-GTGGAGGAGCTCTCAGGGA-3'	304
	Reverse 5'-AGGCACCCAGGGTGTATGCAA-3'	
Bax	Forward 5'-ACACAGACTCCCCCGAGAG-3'	116
	Reverse 5'-GAGCACCAGTTTGTGGCAA-3'	

본 연구의 실험에서 측정된 결과는 각각의 실험마다 독립적으로 3회 이상 실시하였으며, 얻어진 실험 결과는 평균과 표준 편차 또는 %를 사용하여 나타내었다. 각 군간 평균과 표준 오차 값은 SPSS 12.0(IBM, Seoul, Korea) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석 후, Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 처리군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 내의 효소 활성 저하 유도

RCE 처리에 따른 MDA-MB-231 세포의 활성도를 측정하기 위하여, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)의 환원 능력을 formazan 형성으로 측정하는 MTT assay로 세포의 증식과 세포 생존을 측정하였다(Mosmann 1983). 세포 활성은 첨가된 RCE 농도 의존적으로 감소하였으며($p < 0.05$)(Fig. 1), 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 대조군에 비하여 약 86%로 세포 활성이 저하되었다. 300과 400 $\mu\text{g/mL}$ 처리군의 경우에는 대조군에 비하여 각각 64 및 45%로 유의적으로 감소된 세포 활성을 보여주었을 뿐만 아니라, 세포의 부착 및 신장의 상태도 RCE 농도가 증가하면서 낮은 세포 활동을 보여 주었다. 농도가 높아짐에 따라 세포막 변형과 핵의 응축이 일어난 세포들이 증가하였고, 더불어 사멸한 세포가 plate 바닥에서 떨어져 배양액에 부유하는 것이 관찰되었다. Black raspberry에 함유된 다량의 anthocyanin을 이용하여 인체 유방암 세포 MCF-7의 형태학적 변화를 관찰한 결과,

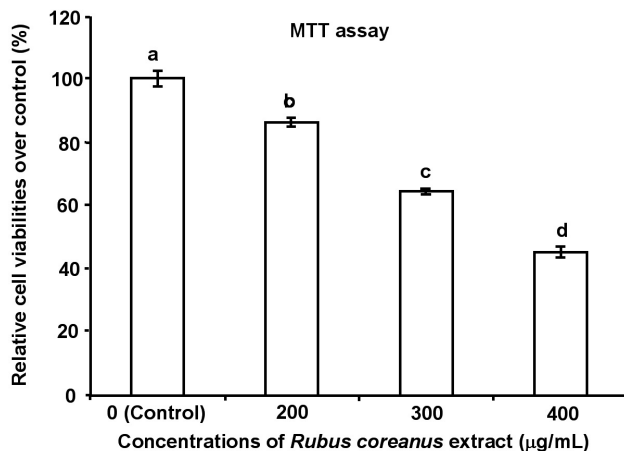


Fig. 1. The effect of *Rubus coreanus* extract (RCE) on the viability of breast cancer MDA-MB-231 cells.

To evaluate the cell viability, the cells were treated with RCE at final concentrations of 0, 200, 300 and 400 $\mu\text{g/mL}$ for 24h. MTT assay was performed after the treatment. Cell viability decreased in a dose-dependent manner. The values are presented as mean \pm S.D. obtained from three replicate experiments. Bars with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$.

세포의 형태, 크기가 줄어들었으며, 세포질 조각들이 분리되어 부유하는 것이 관찰되었다고 연구된 바 있다(Suganya *et al* 2011). 이 같은 세포의 형태학적인 변화는 세포 사멸의 전형적인 현상으로, RCE가 농도 의존적으로 유방암세포의 세포 증식 억제 및 사멸을 유도함을 보여준 것이다.

MTT 환원시키는 효소 활성으로 인하여 미토콘드리아의 malate, glutamate 및 succinate의 MTT 환원 능력은 물론, 세포 내 흡수 작용으로 endosome 또는 lysosome 지역으로 MTT가 이동하여 formazan을 형성한다고 알려져 있다(Liu *et al* 1997). 상기한 MTT 분석 결과는 RCE 추출물의 다양한 성분들에 의하여 MDA-MB-231 세포의 활성 저하를 유도하는 것으로 사료된다. 비록 복분자 추출물을 이용한 유방 암세포에 대한 이전의 연구 보고가 거의 없는 상황이므로, 이 같은 활성 저하 유도 결과의 직접적인 비교는 곤란하겠지만, 복분자 와인 또는 그 추출물을 이용하여 HT-29 대장 암세포 및 LNCaP 전립선 암세포에 대한 증식 억제 효과가 다양한 농도인 100 ~ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적 세포 활성 감소를 보고하였다(Jeong *et al* 2010). 또, 2종의 전립선 암세포에서도 200 ~ 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 복분자 에탄올 추출물이 세포 활성을 농도에 따라 저하시킨다고 보고하고 있어(Kim *et al* 2012b), 본 실험에서 이용된 농도와 유사한 범위에서 농도 의존적인 암세포의 세포 활성 저하와 공통성을 보인다.

2. 세포막 투과성 손상 및 사멸 세포 유도

MTT assay 결과, 보여준 세포 활성의 저하가 유사하게 처리한 각 실험군의 세포에 대한 세포막의 투과성 증가와 연관이 있는지를 조사하기 위하여 Hoechst 33322와 PI로 간단한 이중 염색을 한 결과, PI에 염색되는 세포 비율이 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 약간 증가하는 경향을 보여주었지만, 300과 400 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 각각 37과 71%로 PI로 염색된 세포수가 유의적으로 증가함을 보여주는 RCE에 대한 농도 의존성을 보여 주었다(Fig. 2).

PI는 분자량이 약 668 Da으로 생존세포에는 투과가 되지 않으며, 핵을 염색할 수 있으므로 형광 염료의 특성(Sigma-Aldrich data sheet)을 갖기 때문에 세포막의 PI에 대한 투과성의 증가로 세포막의 손상을 추정할 수 있으며, 농도가 높아질수록 세포막의 손상은 사멸로 이어질 수 있기 때문에 세포 사멸을 측정하는 방법으로 다양한 시스템에서 성공적으로 이용되었다(Belloc *et al* 1994, Reynolds *et al* 1986). 따라서 첨가된 RCE의 생리 활성 물질들이 세포 내의 효소 활성을 저하시키는 세포 활성 저하시킬 뿐만 아니라, 동시에 세포막의 투과성에 손상을 가져온다고 추정된다(Lee & Kang 2010).

3. 세포 사멸 유형과 세포 사멸 과정 결정

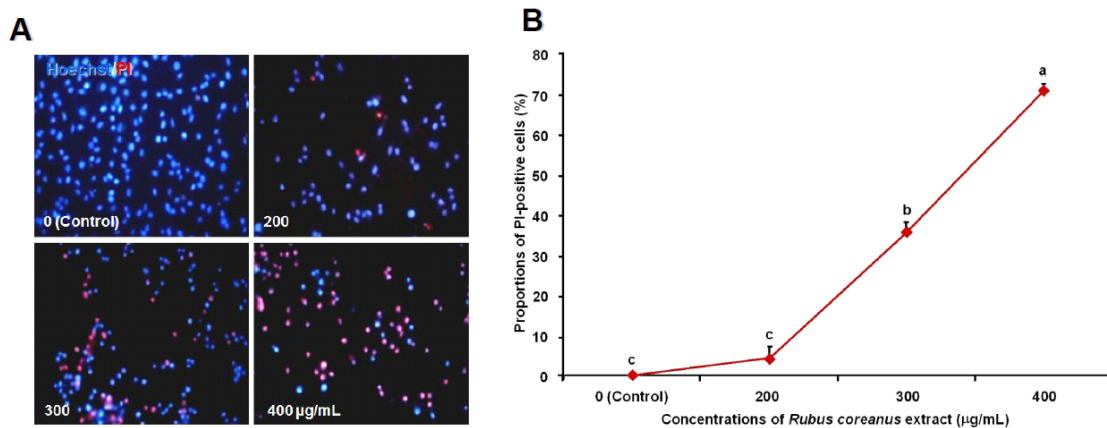


Fig. 2. The effect of *Rubus coreanus* extract (RCE) on the death of breast cancer MDA-MB-231 cells, measured by a double staining.

(A) The cells were stained with Hoechst 33342 (Hoechst, blue) and propidium iodide (PI, red). After 24h of incubation with culture medium containing 0, 200, 300 and 400 µg/mL RCE, the stained cells were observed with fluorescence microscopy ($\times 100$). The merged images of Hoechst and PI were shown here. Live cells have normal-shaped nuclei with either faint Hoechst staining or no PI staining. Whereas dead cells were brightly stained with PI or pinkish nuclei in the merged images. (B) Quantitative analysis of the dead cells (PI-positive). The proportions of dead cells were scored and presented percentages of the total number of cells counted. The values are presented as mean \pm S.D obtained from three replicate experiments. Different alphabet at each point represents significant differences among the groups at $p < 0.05$.

Apoptosis Detection Kit을 이용하여 세포 죽음의 유형과 세포 사멸 단계를 비교적 보다 상세하게 분리하기 위하여 annexin V-FITC와 PI를 이용하였다. 그 결과, 대조군의 세포들은 매우 적은 세포들이 24시간에 괴사된 것을 보여 주었다 (Fig. 3A). 그러나 대부분(99%)의 세포들은 생존 세포로 분포하여 있었으며, 1% 미만의 세포만이 초기 또는 말기 세포 사멸 과정을 보여 주었다(Table 2). 그러나 RCE 200 µg/mL 처리군에서는 생존 세포 49%, 초기 사멸 세포 50%로 급격하게 세포 분포의 변화를 보여주었다(Fig. 3B & Table 2). 더 높은 농도인 RCE 300과 400 µg/mL 처리군에서는 생존세포가 모두 1% 미만으로 scattering 되는 분포와 함께 초기 사멸 세포도 각각 52와 3%의 분포의 변화를 보였다(Fig. 3C, 3D & Table 2). RCE 300 µg/mL 처리군에서는 200 µg/mL 처리군에서 보이지 않던 후기 사멸 중인 세포 비율이 47%로 나타나(Table 2), 본 실험의 RCE 처리 24시간 경우, RCE 내의 생리 활성 물질들의 세포 사멸을 유도하는 특정 역치 농도가 200에서 300 µg/mL 사이에 이른다는 것을 알 수 있었다. 한편, 400 µg/mL 처리군에서는 후기 세포 사멸이 82%로 증가됨과 동시에 세포 독성을 일으키는 생리 활성 물질들의 영향으로 대조군을 포함한 다른 처리군에서 1% 미만에 해당하던 세포 괴사의 비율이 15%에 달하는 세포 분포를 보였다(Fig. 3D & Table 2).

이상의 세포화학적 결과들을 연결시켜 생각하면, MTT 분석으로 나타난 세포 활성 감소, 이중 염색으로 보여준 PI에 대한 세포막의 투과성 증가로 세포 사멸을 유도하게 되며,

Table 2. Proportions (%) of the cells analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) revealed different cellular processes of apoptosis in breast cancer MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of RCE for 24h*

Cells at different death processes	Proportions of cells at the following concentrations of RCE(%)			
	0(Control) µg/mL	200 µg/mL	300 µg/mL	400 µg/mL
Live	99.13	49.65	0.11	0.63
Early apoptosis	0.75	50.3	52.35	2.7
Late apoptosis	0.04	0.03	47.39	82
Dead	0.08	0.01	0.15	14.67

* Only the mean values shown from the mean \pm S.D. obtained from three replicate experiments.

annexin V의 분석으로 이들 세포 사멸의 점진적인 과정을 이용한 RCE 농도에서의 각 세포 사멸의 특성이 다르게 양상을 나타내었으므로, 세포 생존성에 대한 저해 작용으로 결국 세포 사멸을 유도하여 유방암세포에 대한 항암 작용을 보이는 것으로 사료된다.

4. 세포 사멸 관련 유전자 발현 유도

상기한 세포 사멸의 세포화학적 분석 결과가 처리된 유방암세포에서 세포 사멸 관련 유전자의 발현에 영향을 주는지를 결정하기 위하여 RT-PCR 분석으로 유전자 발현을 조사

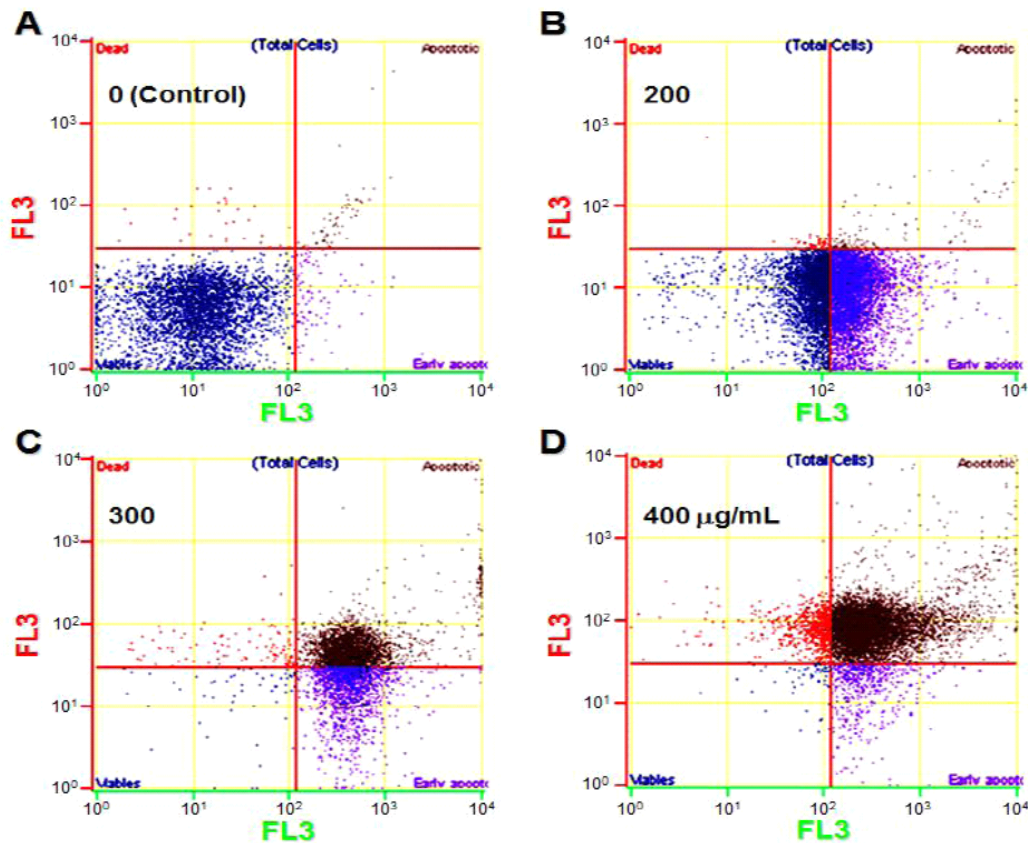


Fig. 3. The effect of *Rubus coreanus* extract (RCE) on the death process of breast cancer MDA-MB-231 cells, analyzed by the Apoptosis Detection kit using an annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC, green) antibody and propidium iodide (PI, red). (A) In the control group, a very small number of cells are already dead, which may indicate necrotic cell death. However, most of the cells were live ones, found in the lower left compartment with very little green fluorescence. (B) Early apoptotic cells were found in the shifted compartment, in the bottom right, at 200 $\mu\text{g/mL}$ RCE. (C) As RCE concentration increases to 300 $\mu\text{g/mL}$, 47% of the cells showed late apoptosis with few live cells. (D) About 82% of the cells shifted to the top right compartment, showing late apoptotic stages. There was also an increased level of necrotic cells found (15%). The cells were stained with FITC-annexin V antibody and PI after 24h of treatment with RCE at different concentrations. The stained cells were analyzed by FACS for scattering. A representative FACS result was shown. For the analysis, three replicate experiments were performed.

하였다.

세포 사멸을 억제, 지연시켜 세포의 항사멸 인자인 Bcl-2 유전자(Reed 1994)의 발현이 RCE 처리군에서 유의적으로 크게 감소되는 것을 볼 수 있었으며, 반면에 사멸 인자인 Bax 유전자(Reed 1994)의 발현은 대조군과 유사한 경향이 200과 300 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 보이지만, 400 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 매우 크게 발현량이 증가되었다(Fig. 4A). 이들 두 유전자는 다양한 암 환자의 치료에 따르는 예후 평가에 매우 중요한 항목으로 Bax/Bcl-2 또는 Bcl-2/Bax 비율로 이용되어 왔다(Mackey *et al* 1998, Gross *et al* 1999, Del Poeta *et al* 2003, Hidadyt 2013). Yang *et al*(1995)에 의하면 정상세포에서는 Bcl-2와 Bax는 heterodimer로 존재하는데, 산화 스트레스로 의한 DNA 손상을 받으면 p53이 증가하여 세포 내 Bax의 발현이 증가되면 Bax homodimer로 평형이 기울어 세포 사멸이 증가되고,

반대로 Bcl-2의 발현이 증가되면 Bcl-2 homodimer로 평형이 기울어 세포 사멸이 억제된다고 하여, Bcl-2/Bax heterodimer의 복합체 비율이 50% 이하로 떨어지게 되면 세포 사멸이 진행될 수 있다고 보고하였다. 이들 유전자들의 RT-PCR 결과를 바탕으로 Bcl-2/Bax 비율을 대조군에 대하여 상대적인 비율을 정량적으로 나타낸 결과(Fig. 4B)를 보면 RCE 처리로 Bcl-2/Bax 비율이 유의성 있게 크게 감소되는 것을 알 수 있다($p < 0.05$).

한편, 블루베리 추출물을 이용한 MCF-7 인체유방암 세포에 첨가한 후, 세포 사멸 관련 유전자 발현을 분석한 보고에 따르면, 세포 사멸을 억제하는 기능을 갖는 Bcl-2가 블루베리 첨가 시간이 증가함에 따라 저하됨으로써 세포 사멸이 일어남이 관찰되었다(Lee & Kang 2010). 또, 그와 반대로 세포 사멸을 유도하는 Bax의 발현은 블루베리를 첨가한 후 급격히

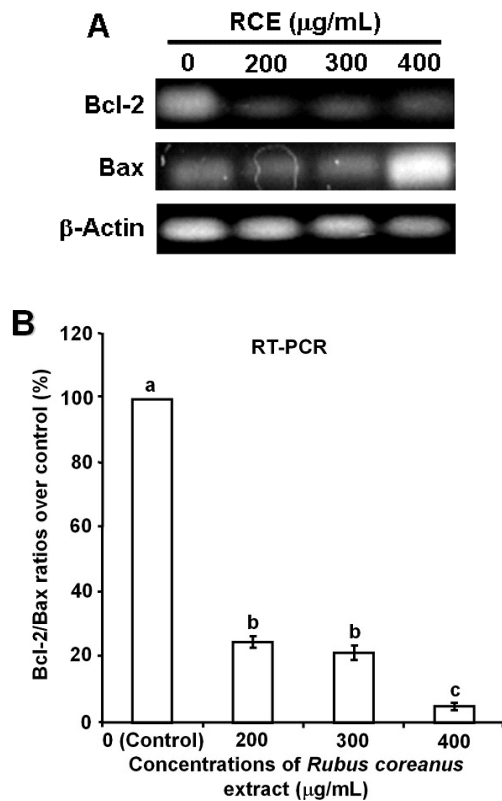


Fig. 4. The effect of *Rubus coreanus* extract (RCE) on Bcl-2 and Bax gene expressions in breast cancer MDA-MB-231 cells.

(A) After 24h of incubation with culture medium containing 0, 200, 300 and 400 µg/mL RCE, Total RNA was isolated, reverse-transcribed (RT) and amplified by PCR with corresponding primer pairs. The RT-PCR bands were a representative result. (B) The results were semi-quantified as a graphic conversion using Image J software. The values are presented as mean±S.D. obtained from three replicate experiments. Different alphabet at each point represents significant differences among the groups at $p < 0.05$.

증가되었다고 보고되어 있어, 본 실험의 Bcl-2와 Bax 유전자의 발현에 유사한 경향을 보이고 있다.

RCE 내의 다양한 영양소들이 협동적 또는 길항적 작용 이외에도 독성으로 작용할 것으로 추정되어, 일부 세포 사멸 유도는 물론, 괴사도 유도할 것으로 생각할 수 있다. 그러나 세포 사멸 경로의 주요 두 유전자가 RCE 처리에 따라 증감을 보여주어 처리된 암세포에서 생화학적 세포 사멸 경로의 유전자가 RCE의 생리 활성 물질들에 의하여 결과적으로 활성화 또는 억제되어 세포 사멸을 유도한다는 것을 명확히 보여준다고 하겠다. 따라서 세포 활성 저하, 세포막 투과성 증가, 사멸 유도의 세포화학적 현상뿐만 아니라, 세포 신호 경로의 사멸 관련 유전자의 발현은 증가, 생존 유전자의 발현은 억제 조절하여 유방 암세포의 사멸을 유도하는 항암 효

능이 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서 이용된 세포화학적 실험 결과들과 유전자 발현이, 블루베리를 처리한 MCF7(Lee & Kang 2010)과 적양배추를 처리한 MDA-MB-231 세포(Nam & Kang 2013)에서도 농도 의존적으로 유사한 경향이 관찰되었다.

5. 세포 사멸 관련 단백질 발현 유도

세포 사멸 관련 전사물과는 달리 세포 내에서의 활성을 직접적이고 실질적인 지표인 단백질 수준에서의 유전자 발현 및 유지도 Western blot을 통하여 분석하였다. p53은 DNA 손상 또는 세포 내의 신호에 따라 세포 주기 진행의 억제 및 apoptosis를 유발하는 종양 억제 유전자로(Vogelstein & Levine 2000), 또 Caspase-3는 apoptosis를 유도하는 마지막 단계에서 활성화되어 여러 세포에서 세포 사멸 유도 유전자로 알려져 있다(Yang *et al* 2005). 처리한 세포의 이들 단백질 발현을 분석한 결과, p53, Caspase-3 및 Bax는 발현 정도가 농도의존적으로 점진적으로 증가하는 경향을 띄었다(Fig. 5A). 한편, Bcl-2는 낮은 농도에서는 뚜렷하진 않지만, 최종농도 400 µg/mL 처리군에서 발현 정도가 급격히 감소하였다. Aiyer *et al*(2012)의 연구에서도 다양한 berry 추출물을 유방암 세포에 첨가, 배양한 후, 유전자 발현을 관찰한 결과, Bax와 p53의 발현은 증가, Bcl-2 발현은 감소됨을 보여주는 항암 효과를 보여 주었다.

또한, RCE 처리에 따라 MDA-MB-231 세포 사멸을 유발시켜 Caspase-3의 신호가 증폭되는 것을 관찰할 수 있었다. Yang *et al*(1997)의 연구에 의하면 Caspase-3는 Caspase-8와 9의 초기 신호를 증폭시킴으로써 세포 사멸을 일으키는데 중요한 역할을 하며, Caspase의 감소와 결핍은 각종 암에서 발견되며, 핵의 단백질 구조에 손상을 일으킨다고 보고하였다. 본 실험 결과에서도 세포 사멸에서 결정적인 역할을 하는 Caspase-3의 활성이 RCE 처리 농도가 높아질수록 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5B)($p < 0.05$). 이와 더불어, Bcl-2/Bax 단백질 비율도 전사물의 경우와 유사한 경향을 띄는 경향을 보여 주었다(Fig. 5C).

이 같은 결과로부터 RCE는 MDA-MB-231 세포의 단백질 수준에서 Bcl-2의 발현은 억제하고, Bax, p53 및 Caspase-3의 활성을 증가시켜, 농도의존적으로 세포 사멸 경로의 생화학적 프로그램을 활성화시켜 관련된 세포 사멸 유전자를 mRNA 수준뿐만 아니라, 단백질 수준에서도 조절을 한다는 것을 확인하였다.

결론 및 요약

본 연구는 복분자 에탄올 추출물이 인체 유방암 MDA-MB-

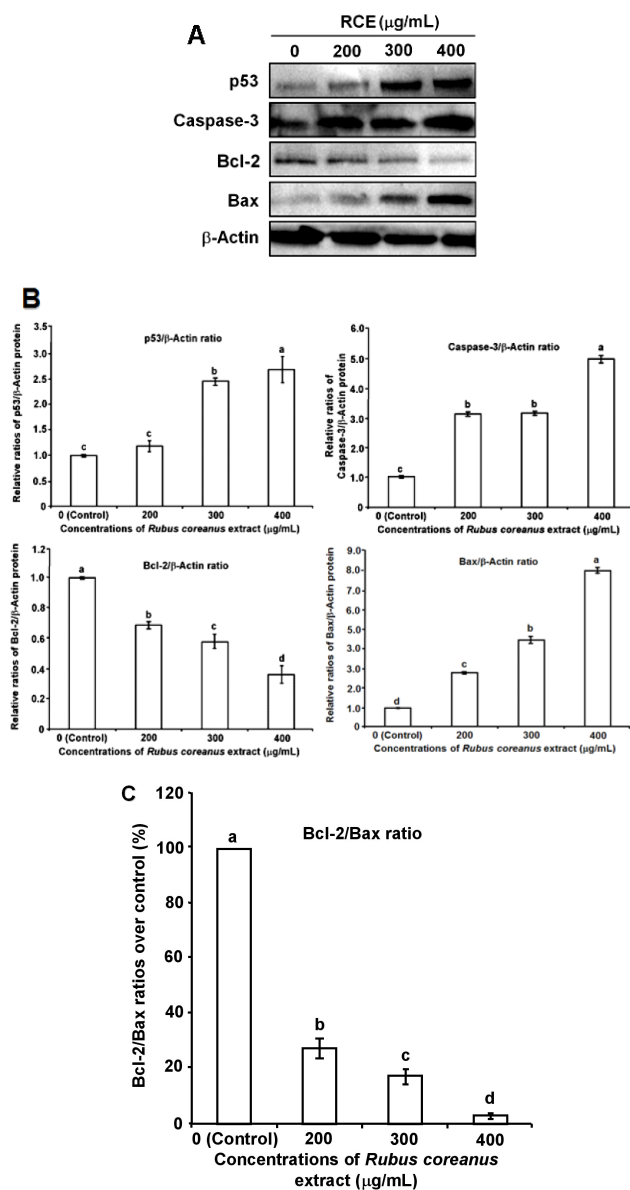


Fig. 5. The effect of *Rubus coreanus* extract (RCE) on apoptosis-related gene expressions at protein levels in breast cancer MDA-MB-231 cells.

(A) After 24h of incubation with culture medium containing 0, 200, 300 and 400 μg/mL RCE, cell lysates were analyzed by SDS-PAGE, followed by Western blot analysis using the corresponding antibodies and color reaction. A representative immunoblot was shown. (B) Densitometric presentation of the Western blot results. The protein bands were analyzed by ImageJ software. (C) The ratios of Bcl-2/Bax protein were also obtained from the values at different concentrations of RCE. The values are presented as mean±S.D. obtained from three replicate experiments. Different alphabet at each point represents significant differences among the groups at $p < 0.05$.

231 세포 활동에 변화를 유도시켜, mRNA와 단백질 수준에서 사멸 관련 유전자의 발현을 유도하는 효과를 규명하기 위

하여 수행하였다. 유방암세포를 복분자 추출물(*Rubus coreanus* extract, RCE)을 0(대조군), 200, 300, 및 400 μg/mL를 첨가하고, 24 시간 후 MTT 분석으로 세포 활성을 조사한 결과, RCE 첨가 농도에 의존적으로 formazan 환원 활성이 감소함을 보여 주었다($p < 0.05$). 이러한 세포 활성의 감소는 Hoechst 33322와 propidium iodide(PI)로 이중 염색하여 얻은 세포 사멸의 증가와 밀접한 연관성을 가짐을 보여 주었다($p < 0.05$). Apoptosis Detection kit를 이용한 세포막의 투과성 및 세포 사멸의 단계의 점진적인 과정을 자세히 분석하기 위하여 FACS 분석을 한 결과, RCE 농도 증가에 따라 막투과성의 증가, 초기 사멸 과정을 보이는 세포가 300 μg/mL에서는 약 52%에 달하지만, 400 μg/mL에서는 약 82%의 후기 세포 사멸을 보여주어, 농도의존적으로 세포 사멸을 유도하였다. 더구나, RCE 처리군 별 세포 사멸 관련 유전자 발현을 mRNA와 단백질 수준에서 조사한 결과, 세포 사멸 프로그램의 주요 유전자인 Bax와 Caspase-3 발현이 농도의존적으로 유의적으로 증가하였으며, 반면에 Bcl-2의 발현은 300과 400 μg/mL 군에서 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 따라서 복분자 추출물은 유방암세포의 세포 활성 저하 및 막투과성의 손상 유도뿐만 아니라, 세포 사멸 프로그램에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하여 세포 사멸을 유도하는 효과를 갖는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 덕성여자대학교 자연과학연구소의 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

문헌

- Aiyer HS, Warri AM, Woode DR, Hilakivi CL, Clarker R (2012) Influence of berry polyphenols on receptor signaling and cell death pathways: Implications for breast cancer prevention. *J Agric Food Chem* 60: 5693-5708.
- American Cancer Society (2013) Breast cancer: Facts & figures 2013-2014. American Cancer Society Inc., Atlanta. pp 4-11.
- Beak BK, Lim CW, Lee EY, Whang IS, Kwon HN, Lee HK, Lee SI, Lee HJ, Jeon BH (2004) Effects of raspberry wine on testosterone level of Sprague Dawley rats. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 18: 1007-1013.
- Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jallouste C (1994) A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17: 59-65.
- Bhandary B, Lee GH, Marahatta A, Lee HY, Kim SY, So BO, Kwon JW, Song JY, Lee HK, Kim HR, Chae SW, Chae HJ

- (2012) Water extracts of immature *Rubus coreanus* regulate lipid metabolism in liver cells. *Biol Pharm Bull* 35: 1907-1913.
- Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Beliveau R (2007) Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF α -induced activation of NF- κ B by edible berry juice. *Anticancer Res* 27: 937-948.
- Choi C, Lee H, Lim H, Park S, Lee J, Do S (2012) Effect of *Rubus coreanus* extracts on diabetic osteoporosis by simultaneous regulation of osteoblasts and osteoclasts. *Menopause* 19: 1043-51.
- Chen WF, Huang MH, Tzang CH, Yang M, Song MS (2003) Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta* 1638: 187-196.
- Coates EM, Popa G, Gill CI, Mccann MJ, Dougall GJ, Stewart D, Rowland I (2007) "Colon-available" raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on *in vitro* models of colon cancer. *J Carcinog* 6: 4-16.
- Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI (2003) Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 101: 2125-2131.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes* 13: 1899-1911.
- Hidayat T, Yulianto S, Barlianto W, Sujuti H, Chandra Kusuma HMS (2013) Increase of Bcl-2/Bax ratio corelated with decrease of lymphocyte apoptosis: A study in the bronchiolus and lung of asthmatic mice. *Int J Med Med Sci* 5: 191-197.
- Jakobek L, Seruga M, Seruga B, Novak L (2011) Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. *Int J Food Sci Technol* 44: 860-868.
- Jeong JH, Jung H, Lee SR, Lee HJ, Hwang KT, Kim TY (2010) Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chemistry* 123: 338-344.
- Ju HK, Cho EJ, Jang MH, Lee YY, Hong SS, Park JH, Kwon SW (2009) Characterization of increased phenolic compounds from fermented bokbunja and related antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal* 49: 820-827.
- Jung KA, Han D, Kwon EK, Lee CH, Kim YE (2007) Anti-fatigue effect of *Rubus coreanus* Miquel extract in mice. *J Med Food* 10: 689-693.
- Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323.
- Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Park JH (2005) Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanus* in HT-29 human colon cancer cells. *Nutr* 21: 1141-1148.
- Kim HH, Choi PH, Yoo JS, Jeon H, Chae BS, Park JS, Kim SH, Shin TY (2012a) Ripe fruit of *Rubus coreanus* inhibits mast cell mediated allergic inflammation. *Int J Mol Med* 29: 303-310.
- Kim YR, Kim JN, Lee SM, Lee HA, Park SH, Kim YS, Kim JH (2012b) Chemopreventive effects of *Rubus coreanus* Miquel on prostate cancer. *Biosci Biotech Biochem* 76: 737-744.
- Lee SN, Kang KJ (2010) The effect of blueberry extract in gene expressions related to apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *J East Asian Soc Dietary Life* 20: 30-36.
- Liu D, Chen Z (2013) The effect of curcumin on breast cancer cells. *J breast Cancer* 16: 133-137.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69: 581-593.
- Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N (1998) bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology* 52: 1085-1090.
- Ministry of Health and Welfare (2012) and National Cancer Center. Cancer Facts & Figures 2012 in the Republic of Korea, Gyeonggi-Do. pp 8-15.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Nam MK, Kang KJ (2013) The effect of red cabbage extract on the apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 8-16.
- Navindra P, Seeram NP (2008) Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. *J Agric Food Chem* 56: 630-635.
- Park YK, Choi SH, Kim SH, Jang YS, Han JG, Chung HG (2008) Functional composition and antioxidant activity from the fruit of *Rubus coreanus* according to cultivars. *J Korean Wood Sci Technol* 36: 102-109.
- Pierce JP, Natarajan L, Caan BJ, Parker BA, Greenberg ER, Flatt SW, Rock CL, Kealey S, Al-Delaimy WK, Bardwell WA, Carlson RW, Emond JA, Faerber S, Gold EB, Hajek RA, Hollenbach K, Jones LA, Karanja N, Madlensky L,

- Marshall J, Newman VA, Ritenbaugh C, Thomson CA, Wasserman L, Stefanick ML (2007) Influence of a diet very high in vegetables, fruit and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer: the women's healthy eating and living randomized trial. *JAMA* 298: 289-298.
- Ravoor S, Vadhaam MV, Agil F, Gupta RC (2012) Inhibition of estrogen-mediated mammary tumorigenesis by blueberry and black raspberry. *J Agric Food Chem* 60: 5547-5555.
- Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6.
- Reynolds CP, Black AT, Woody JN (1986) Sensitive method for detecting viable cells seeded into bone marrow. *Cancer Res* 46: 5878-5881.
- Seeram NP, Herber D (2007) Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation. *ACS Symposium Series* 956: 326-336.
- Suganya DP, Saravana KM, Mohan SD (2011) Evaluation of antiproliferative activity of red sorghum bran anthocyanin on a human breast cancer cell line (MCF-7). *Int J Breast Cancer* 2011: 1-6.
- Vogelstein BD, Lane AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Kosmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for bcl-XL and bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J (1997) Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132.
- Yang HM, Oh SM, Lim SS, Shin HK, Oh YS, Kim JK (2008) Antiinflammatory activities of *Rubus coreanus* depend on the degree of fruit ripening. *Phytother Res* 22: 102-107.
- Yang XH, Edgerton S, Thor AD (2005) Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy. *Int J Oncol* 26: 1675-1680.
- Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH (2001) Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Korean J Food Sci Technol* 34: 898-904.
- Zhou J, Zhong Y (2004) Breast cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 1: 247-255.

접 수: 2013년 09월 17일
최종수정: 2013년 12월 20일
채 택: 2013년 12월 30일