

윤 현 근 교수지도

석사학위 청구논문

A 549 Lung Cancer Cell에서 사과농축액에
의한 NF κ B 활성화 억제 효과에 관한 연구

2011년

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

조 우 리

A 549 Lung Cancer Cell에서 사과농축액에
의한 NF κ B 활성화 억제 효과에 관한 연구

윤 현 근 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2011년 5월

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

조 우 리

인 준 서

조우리의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 한 영 숙 인

심사위원 이 승 민 인

심사위원 윤 현 근 인

성신여자대학교 대학원

논문개요

본 연구는 인간 폐암 세포인 A549 세포에서 사과 농축액과 Quercetin 3-β-D glucoside(Q3G)에 의한 세포 성장 억제 기전을 연구하였다. 세포 성장 억제 기전의 지표인 Nuclear factor-κB(NFκB)와 Phospho-IκBa(p-IκBa)의 영향을 알아보기 위해 사과 농축액 0, 5, 10, 20, 50 mg/mL와 사과의 대표적인 성분인 Q3G 0, 5, 10, 50, 100 μM 농도로 시료를 처리하고 NFκB의 핵 내 유입을 유도하기 위해 10 ng/mL의 TNF-α를 처리하여 세포 증식에 미치는 영향, NFκB의 함량 변화, NFκB의 핵 내 유입 유도 효소인 proteasome의 활성 억제 정도를 분석하였다.

1. 세포 독성(Cytotoxicity) 및 세포 증식(Cell Proliferation)의 변화는 Methylene blue법과 MTT법으로 분석하였으며 세포의 독성은 10%미만의 독성율을 나타낸 농도를 세포에 급성독성을 미치지 않는다고 보았다. 사과 농축액을 처리한 세포의 경우 40 mg/mL 이하의 농도에서 10%미만의 독성율을 나타냈고 60-200 mg/mL의 농도에서는 11.7-47.7%로 독성율이 증가하였다. Q3G를 처리한 세포의 경우 10%미만의 독성율을 나타낸 농도는 130 μM 이하였으며 10, 160, 200 μM 농도에서도 14.4, 10.9, 16.2%의 독성을 나타낸 것으로 나타났다.

세포의 증식은 사과 농축액을 처리한 세포의 경우 10, 20 mg/mL의 농도에서 증가하는 경향을 보이다가 40 mg/mL 이상의 농도부터는 농도가 증가 할수록 감소되었고, Q3G를 처리한 세포의 경우 전체적으로 증식의 감소가 나타났다. 이를 통하여 사과 농축액 및 Q3G가 A549 인체 폐암세포에 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

2. A549 폐암세포 핵 내 NFκB의 변화는 western blot법으로 분석하였다. 사과 농축액을 5 mg/mL로 처리 하였을 때 증식이 다소 증가되는 경향을 나타내었으나 처리농도가 10, 20, 50 mg/mL로 증가 되면서 band가 나타나지 않았고, 정량 결과 NFκB의 발현 값이 control과 같은 100%로 나타났다. 이를 통계 처리한 결과 유의적으로($p < 0.0001$) 감소하여 시료의 농도가 증가 할수록 NFκB가 감소되는 경향을 나타내었고 이를 통해서 NFκB의 감소가 A549 폐암세포의 증식억제와 관련성이 있음을 확인할 수 있었다.

반면, Q3G를 처리한 A549 폐암세포에서 western blot법 결과 Q3G 5, 10, 100 μM 농도에서 NFκB가 0 μM에 비해 소폭 증가하였고 50 μM의 농도에서 감소했지만 큰 차이가 없는 것으로 나타나 본 연구에서는 Q3G가 NFκB의 핵 내 유입을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

3. A549 폐암세포 세포질 내 IκBa의 변화는 western blot법으로 분석하여 사과 농축액을 농도별로 처리 하였을 때의 증식억제는 p-IκBa는 농도가 증가함에 따라 감소하는 것을 알 수 있었다. 이를 정량하여 수치화한 결과는 5 mg/mL의 농도에서는 다소 증가하는 양상을 보이다가 10 mg/mL 이상의 농도부터는 그 농도가 증가 할수록 p-IκBa가 감소하는 것으로 보아 사과 농축액은 IκBa가 인산화 되는 것을 억제하여 NFκB의 핵 내 유입이 감소되는 것으로 생각되었다. 통계 분석 결과에서 0.05이하 수준의 유의성($p = 0.0301$)이 확인 되었다.

이를 통하여 사과 농축액의 영향으로 IκBa가 인산화 되는 것을 억제하여 A549 폐암세포의 증식억제가 나타난 것으로 해석된다.

4. 세포질 속에 있는 I κ B α 분해 및 NF κ B의 핵 내 유입 유도 효소인 proteasome은 형광계를 이용하여 측정하였다. 사과 농축액의 농도가 증가할수록 proteasome의 활성이 감소하는 경향을 나타내었고 특히, 사과 농축액을 50 mg/mL 농도로 폐암세포에 처리한 시료에서 11.3%로 가장 낮은 proteasome의 활성을 보였고 유의적으로 감소하였다($p < 0.0001$).

반면 Q3G를 처리하여 얻은 세포질의 proteasome 활성은 0 μ M과 비교하여 농도가 5, 10, 50, 100 μ M로 증가할수록 50%내외로 감소된 활성이 나타났으며 그 중 50 μ M에서 48%로 비교적 가장 낮은 proteasome의 활성 감소를 보였다. 통계 처리한 결과에서는 유의적인 결과가 $p = 0.0914$ 로 나타났다.

이를 통하여 사과 농축액이 proteasome의 활성을 억제함으로써 I κ B α 분해 및 NF κ B의 핵 내 유입 유도를 억제함에 따른 A549 인체 폐암세포의 증식억제를 나타낸 것으로 해석된다.

이상의 결과를 종합해 보면 사과 농축액의 처리는 폐암세포에서 세포의 증식의 감소를 나타냈고, proteasome의 활성 감소와 NF κ B 발현 감소를 확인함으로써 proteasome의 활성 감소를 통해 NF κ B의 핵 내 유입의 억제되는 결과를 볼 수 있었다. 폐암세포의 증식에서는 Q3G를 처리한 세포에서 증식감소도 나타나며 농도가 증가하여도 20%이하의 급성 독성율이 나타나는 것으로 보아 사과에서 정제된 물질인 Q3G가 세포 증식 억제에는 효과적인 것으로 사료된다. 그러나 암의 발생, 세포의 증식, 분화 세포자기사멸, 염증반응 및 세포 내 신호전달계를 포함한 다양한 생물학적 반응의 중심적인 역할을 하는 전사조절인자인 NF κ B의 발현 감소와 이 NF κ B가 핵 내로 유입되는 것을 돕는 효소인 proteasome의 활성 감소를 보이는 것은 사과 농축액의 영향이 더 큰 것으로 나타나서 NF κ B억제를 통한 항 폐암에는 사과 농축액이 효과적인 것으로 사료된다. 하지만 사과의 주성분으로 잘 알려

진 것이 Q3G인데 폐암세포의 증식 감소를 나타낸 것이 사과 성분 중 quercetin의 영향인지의 상관관계가 불분명하므로 사과 농축액을 분획하여 사과 성분 중에서 폐암세포의 억제에 직접적인 영향을 미친 성분을 밝혀내고 그 기작을 확인하는 연구가 계속적으로 이루어져야 하며 더 나아가 사과를 이용한 항 폐암 기능성 식품 및 약제의 개발이 시급하다.

목 차

논문개요

I. 서론	1
1. 서언	1
2. 이론적 배경	7
1) 세포자기사멸(Apoptosis)	7
2) Nuclear factor- κ B(NF κ B)	9
3) Proteasome	11
II. 연구재료 및 방법	13
1. 연구재료	13
2. 연구방법	14
1) A549 세포의 배양	14
2) 사과 농축액 제조	15
3) A549 세포 독성율 (Cytotoxicity) 측정	17
4) A549 세포 증식율 (Cell Proliferation) 측정	18
5) 식물유래유용물질과 TNF- α 의 처리	19
6) 핵 추출물(Nuclear Extract)과 세포질 추출물(Cytoplasmic Fraction)의 획득	21

7) Western Blot	25
8) Proteasome 활성 측정	26
9) 통계처리	26
Ⅲ. 연구결과 및 고찰	27
1. 세포 독성율(Cytotoxicity) 및 세포 증식율(Cell Proliferation)의 변화	27
2. NFκB의 발현 변화	32
3. p-IκBa의 발현 변화	37
4. Proteasome 활성	41
Ⅳ. 결론	44
V. 참고문헌	
ABSTRACT	

List of Tables

Table 1. Rate of deaths from cancer.	2
Table 2. Rates of estimated new cases and deaths from cancer in USA	3
Table 3. Rates of estimated new cases from cancer in USA	3
Table 4. Sample Concentration of Red Apple Extract and Quercetin 3- β -D glucoside.	29

List of Figures

Figure 1. Cell life and cell death pathway.	8
Figure 2. Proposed mechanism of apple extracts to inhibit TNF- α induced NF κ B activation in MCF-7 human breast cancer cell.	12
Figure 3. Process of red apple extract.	16
Figure 4. Process of Apple Extracts and Quercetin 3- β -D glucoside(Q3G) Treatment.	20
Figure 5. Process of Cytoplasmic Fraction preparation.	23
Figure 6. Process of Nuclear Extract preparation.	24
Figure 7. Effect of red apple extracts on cytotoxicity and cell proliferation in A549 cells.	30
Figure 8. Effect of Quercetin 3- β -D glucoside on cytotoxicity and cell proliferation in A549 cells.	31
Figure 9. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced NF κ B activation in A549 cells.	33

Figure 10. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced NF κ B activation in A549 cells.	34
Figure 11. Effect of Quercetin 3- β -D glucoside on TNF- α -induced NF κ B activation in A549 cells.	35
Figure 12. Effect of Quercetin 3- β -D glucoside on TNF- α -induced NF κ B activation in A549 cells.	36
Figure 13. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced phospho I κ B α activation in A549 cells.	39
Figure 14. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced phospho I κ B α activation in A549 cells.	40
Figure 15. Effect of red apple extracts on proteasome activity in A549 cells.	42
Figure 18. Effect of Quercetin 3- β -D on proteasome activity in A549 cells.	43

I. 서론

1. 서언

최근 통계청 2009년 통계에 따르면 전체 암 발생건수는 69,780건이며, 그 중 폐암은 14,919건으로 가장 많은 발생건수를 나타냈다. 또한 자료에 의하면 사망률이 가장 많이 증가한 사인은 암이며, 암 사망률은 인구 10만 명 당 사망자수로 1999년 114.2명이었던 것이 2009년 140.5명으로 점차 증가하고 있는 것으로 나타났다. 그 중 기관지 및 폐암의 사망률은 22.0명에서 30.0명으로 증가하였다(통계청, 2010). 2009년 인구 10만 명 당 497.3명인 총 사망률 중에서 암으로 인한 사망이 28.3%를 차지하였으며, 그 중 폐암은 총 사망률의 6.0%, 암 사망률의 21.4%로 나타났다(Table 1). 2010년 미국의 통계(American Cancer Society, 2010)에 따르면 암 발생 건수 1,530,000건 중 223,000건이 폐암이었으며 이는 암 사망률 중 27.6%를 차지하는 것으로 나타났다(Table 2, 3).

폐암으로 인한 사망자는 상대적으로 암 질환 중에서 높게 나타나는데, 이는 폐암의 조기진단에 활용되는 저선량 단층촬영, 형광기관지내시경 등의 장비가 있으나, 건당 1억원을 상회하는 고비용이며, 치료비용 역시 해마다 증가하고 있을 뿐 아니라(정영원, 2010) 폐암이 초기단계에서 진단하기가 어렵기 때문에 많은 폐암 환자들이 폐암에 대한 적절한 치료를 받을 수 있는 시간을 놓치게 되기 때문이다. (Yoon HG, et al., 2010).

Table 1. Rates of deaths from cancer in Korea

(deaths, per 100,000 population)

Case			Year										
			1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Total death	New cases	Total	245,364	246,163	241,521	245,317	244,506	244,217	243,883	242,266	244,874	246,113	246,942
		male	136,397	136,486	134,058	134,742	134,887	135,218	134,382	133,725	134,922	136,932	137,736
		Female	108,967	107,677	107,463	110,575	109,619	108,999	109,501	108,541	109,952	109,181	109,206
	death	Total	520.2	517.9	504.5	509.7	506.1	503.7	501.0	495.6	498.4	498.2	497.3
		male	576.0	571.9	557.8	557.9	556.6	556.1	550.5	545.7	547.9	553.1	553.7
		Female	464.0	463.3	450.7	461.2	455.4	451.0	451.1	445.2	448.7	443.0	440.7
Total Cancer	New cases	Total	53,845	57,725	58,857	62,598	63,352	64,315	65,117	65,519	67,561	68,912	69,780
		male	34,497	36,958	37,562	39,971	40,103	41,022	41,131	41,841	42,778	43,785	43,846
		Female	19,348	20,767	21,295	22,627	23,249	23,293	23,986	23,678	24,783	25,127	25,934
	death	Total	114.2	121.4	122.9	130.1	131.1	132.6	133.8	134.0	137.5	139.5	140.5
		male	145.7	154.9	156.3	165.5	165.5	168.7	168.5	170.7	173.7	176.9	176.3
		Female	82.4	87.7	89.3	94.4	96.6	96.4	98.8	97.1	101.1	101.9	104.7
Lung, trachea and bronchus Cancer	New cases	Total	11,118	12,306	12,670	13,239	13,335	13,860	14,362	14,549	14,768	15,200	15,343
		male	8,368	9,231	9,514	9,824	9,890	10,365	10,665	10,915	10,986	11,263	11,274
		Female	2,750	3,075	3,156	3,415	3,445	3,495	3,697	3,634	3,782	3,937	4,069
	death	Total	22.0	24.3	24.9	26.1	26.2	27.3	28.2	28.7	29.1	29.9	30.0
		male	32.7	36.0	36.9	38.2	38.4	40.4	41.4	42.6	42.8	44.0	43.8
		Female	11.2	12.5	12.8	13.9	14.0	14.2	15.0	14.7	15.2	15.8	16.3

* 2010. 사망원인통계 통계청

Table 2. Rates of estimated new cases and deaths from cancer in USA

(case, deaths)

Case	New cases			Deaths
	Total	Male	Female	Total
Total Cancer	1,530,000	790,000	740,000	569,500
Lung Cancer	223,000	117,000	106,000	157,300

* Remade table from American Cancer Society. 2010.

Table 3. Rates of estimated new cases from cancer in USA

(case, deaths)

Case			Year								
			Estimated new cases	5-year relative survival rates (percent)							
				White				Black			
2010	1990	1993	1996	1999	1990	1993	1996	1999-			
	1992	1995	1998	2006	1992	1995	1998	2006			
Total Cancer	New cases	Total	1,530,000	62.4	63.5	65.6	69.5	48.3	53.0	55.6	59.8
Lung Cancer	New cases	Total	223,000	14.5	15.1	15.4	17.0	10.8	13.1	12.7	13.3

* Remade table from American Cancer Society. 2010.

이러한 발병률의 증가에도 불구하고 진행성 폐암에 대한 치료는 지난 수

십 년 간 복합항암화학요법 및 방사선 치료에 의존하는 방법에서 크게 진보하지 못하고 있으며, 생존기간을 연장시키는 데도 큰 효과가 없었다. 특히, 심한 부작용을 감수해야 하는 세포독성 항암제의 문제점 때문에 실제 임상에서 약제사용에 한계를 보이고 있어 새로운 치료방법과 약제의 개발이 시급한 문제임이 지적 된 바 있다. (이중혁, 2004)

암에 관한 여러 연구에서 가장 일관성 있게 알려진 사실은 매일 신선한 과일과 채소를 섭취함으로써 만성질환 및 대부분의 암으로부터 위험을 줄일 수 있다는 것이다(Ekhar EZ, et al., 1998, Maurice ES, et al., 1994, Colditz, GA, et al., 1985, Willett WC, 1994, Tavani A, et al., 1995, Dale AC, et al., 1999, Johanna WL, 1999, William AP, et al., 2000, Block G, et al., 1992). 이는 신선한 과일 및 채소에 함유되어있는 생활성 식물유래유용물질(bioactive phytochemicals)때문인데 식물에서 분리된 몇몇 생활성 식물유래유용물질은 항산화 활동을 하고 세포자기사멸(apoptosis)과 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 유도하여 암세포의 성장을 억제한다고 알려져 있다(Dias AS, et al., 2005, Aggarwal S, et al., 2006, Joe AK, et al., 2002).

식물유래유용물질을 함유하는 여러 가지 과실 및 채소가 존재하지만, 본 연구에서는 그 중에서도 우리나라에서 많이 섭취 되고 있는 과실류의 하나인 사과(조상원, et al., 2001)및 그 성분을 이용하여 항암성을 살펴보고자 하며 앞서 살펴본 바와 같이 계속적으로 증가추세에 있는 폐암으로 인한 사망자를 낮추기 위해 보다 효율적인 접근으로 폐암의 치료보다는 예방을 제안한다(Yoon HG, et al., 2010).

사과(Malus pumila var. dulcissima)는 분류학상 장미과에 속하는 다년생 목본식물로서, 과실은 관능 특성이 좋고 영양학적으로 당, 식이섬유, 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 항산화 비타민C 등이 풍부하며, procyanidin, epicatechin,

catechin, ρ -coumaroyl quinic acid, chlorogenic acid, rutin, phloridzin, quercetin, phloridzin, phloretin derivative 등의 다양한 polyphenol을 함유하고 있는 등 무기질이 풍부한 과일이고 또한 과실 자체로 뿐만 아니라 주스, 잼 등 다양한 식품으로 이용되고 있으며, 사과 polyphenol 중 procyanidin이 가장 많이 함유되어 있으며 함유량은 약 207 $\mu\text{g/g}$ 정도이다 (Yun HJ, et al., 2007, Khanizadeh S, et al., 2008).

Akazome(Akazome Y, 2008)은 사과의 polyphenol이 비타민 E와 기타 항산화 효소가 소비되는 것을 막고, *in vivo* 에서도 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고하였고, 전체 사과 추출물에 의해 대장암세포와 간암세포의 성장이 용량 의존적으로 억제되고(Eberhardt MV, et al., 2000) 쥐 모델의 유방암에서도 그 성장이 효과적으로 예방되었다(Liu RH, et al., 2005).

사과 중에서도 특히, 껍질은 페놀 화합물을 다량 함유하고 있으며 항산화 활성과 암세포에 대한 항증식 활성 et al.의 특징이 높게 나타난다(Wolfe K, et al., 2003).

이러한 사과의 대표적인 성분 중 하나인 퀘시틴(Quercetin)은 전립선 암세포의 전이에 필수적인 요소들인 MMP(matrix metalloproteinase)-2와 MMP-9의 표면에 하향 조절 역할을 한다고 보고된 바 있고(Vijayababu MR, et al., 2006) 특히, 유방암, 대장암, 위암을 비롯한 암세포에서 세포주기 정지를 유도하고, 폐암세포에 대해서는 독성을 보인다(Nguyen TTT, et al., 2004, Kuo P, et al., 2004).

기존의 항암연구에서는 사과가 유방암(Yoon HG, et al., 2007), 대장암 등에서 항암성이 있다는 보고가 있고, 폐암에서의 항암성 연구는 Yoon 등(Yoon HG, et al., 2010)에서 보고되었을 뿐 사과를 이용한 폐암 연구들이 그리 많지 않았다.

이에 본 연구에서는 사과 농축액 및 사과의 성분인 Quercetin 3- β -D glucoside(Q3G)를 이용하여 A549 폐암세포에서의 세포자기사멸 및 세포주

기억제 관여인자인 NF κ B, p-I κ B α , proteasome 등의 발현과 작용을 조절하여 폐암세포의 성장을 제어하는 기능성을 보유한 사과유래 기능성 유용 물질의 기능성을 확인하고 그 작용기작을 세포 신호 전달 수준에서 밝히는 것을 목적으로 하였으며 더불어 본 연구가 폐암에서의 사과 항암성의 기초를 쌓아 사과를 이용한 항 폐암 기능성 식품 및 약제의 개발에 까지 이용되기를 기대한다.

2. 이론적 배경

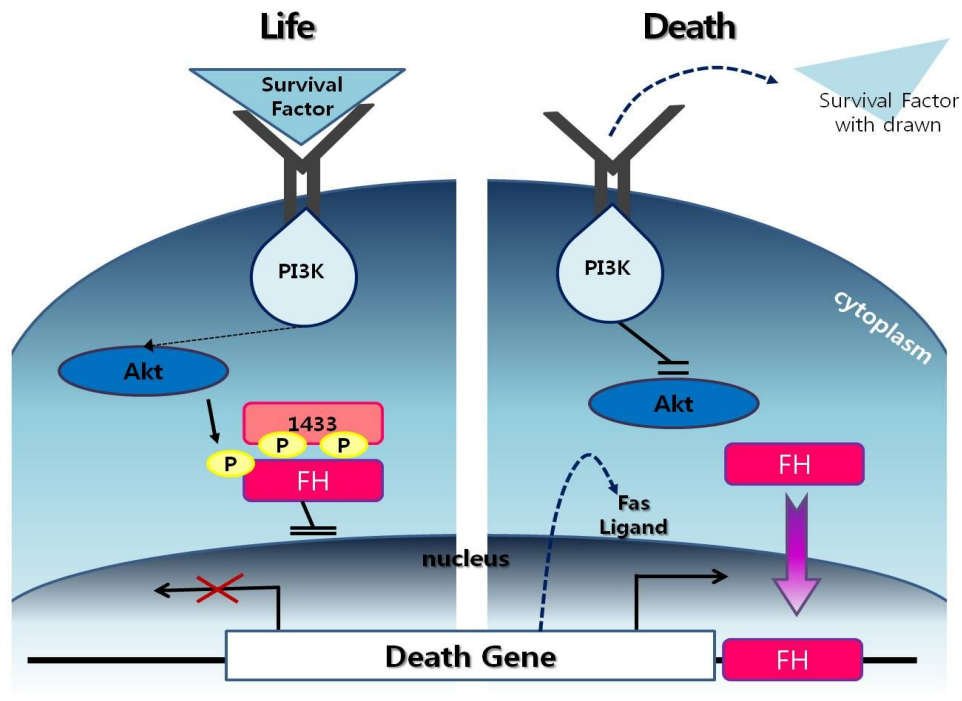
1) 세포자기사멸(Apoptosis)

세포자기사멸은 개체의 발생이나 항상성 유지 조절에 중요한 역할을 하는 정상적인 생리학적 현상이다. 정상적으로 암의 클론을 야기 시키는 세포 즉, 손상된 DNA나 변형된 세포주기를 가지는 세포를 제거하는 기전이다. 세포자기사멸을 억제하는 bcl-2 유전자의 발견으로 세포자기사멸에 대한 저항 획득 또는 역치의 상승이 암발생에 중점적인 역할을 한다는 개념이 정립되었으며(Reed JC, 1994) 암치료에 있어서 세포자기사멸 유도를 치료전략으로 연구되었다. 최근 세포자기사멸 조절에는 많은 유전자들이 관여하고 있으며, 이들 유전자 산물들의 기능과 특징을 조사함으로써 세포자기사멸 현상의 분자생물학적 설명이 가능해 지고 있다. 따라서 효과적인 암의 치료와 예방에 있어서 비정상적인 세포나 암세포의 세포자기사멸 유발은 많은 치료제의 표적이 되고 있다(Barisic K, et al., 2003).

세포자기사멸은 세포주기 교란 의존적 및 비의존적으로 일어날 수 있으며(Fulda, S. et al., 2004), 세포자기사멸의 현상은 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다(Schulze-Osthoff K, et al., 1998, Wylie AH, et al., 1980).

특히, 사과에 함유된 Quercetin에 의해 신호전달체인 AKT가 인산화 되는 것을 막아주어 세포자기사멸 자극 신호체인 FH가 핵 안으로 들어가게 되어 최종적으로 세포자기사멸이 일어난다는 보고가 있다(Spencer, et al., 2003).

이와 같이 세포의 생육과 세포자기사멸로 이끄는 과정은 Figure 1(focus.hms.harvard.edu/1999/Apr2_1999/neuro.html)에 나타내었다.



(Modified from original image by Steven Moskowitz, Advanced Medical Graphics
 from harvard neuro, 1999
focus.hms.harvard.edu/1999/Apr2_1999/neuro.html)

Figure 1. Cell life and cell death pathway

The survival factor IGF-1 may prolong the life of a cell by ordering the capture of death agents. Once stimulated by IGF-1 (left), the PI3-Akt pathway makes a double arrest. Akt adds phosphate groups to two death proteins, BAD and FKHRL1 (FH), creating binding sites for the bulky protein 14-3-3. Binding by 14-3-3 may prevent BAD and FH from moving around the cell and, consequently, from carrying out their death orders. These death orders may be executed when the survival factor is withdrawn (right).

2) Nuclear factor-kappaB(NFκB)

Nuclear factor- κ B (NF κ B) 신호전달계는 암의 발생, 세포의 증식, 분화 세포자기사멸, 염증반응 및 세포 내 신호전달계를 포함한 다양한 생물학적 반응의 중심적인 역할을 하는 전사조절인자이다. NF κ B는 C-Rel, NF κ B1(p50/p105), NF κ B2(p52/p100), RelA(p65), RelB의 5종류가 알려져 있고, 이들은 N말단에 약 300개 아미노산인 RHD(Rel homology domain)으로 특징 지워지며, 이량체(dimer)를 형성하여 NF κ B의 억제물질인 I κ B와 결합한 상태로 세포질 내에 존재하고 있다(Baeuerle P, et al., 1988). 이 중에서 가장 대표적인 물질이 p50/p65의 이량체와 I κ B α 이다. NF κ B의 활성화는 바이러스, TNF, phobol ester, IL-1, LPS, UV, hypoxia 등에 의하여 유발되며, NF κ B에 의하여 조절되는 유전자는 면역기능과 염증조절계와 혈관세포 부착분자 VCAM-1과 E-selectin, ICAM1, MAd-CAM-1, TAP1, LMP2, MHCII change 유전자, iNOS 등이 있으며, anti-apoptotic 유전자로는 manganese superoxide dismutase와 zink finger protein A20, cIAP1, cIAP2 등이 알려져 있다(Baldwin AS, 1996, Lee KY, et al., 1999). 많은 선행연구들에서 NF κ B 활성화의 차단으로 발암원에 의한 암의 발생을 억제하거나 암세포의 증식을 억제하고 세포자기사멸을 유도하는 것으로 알려져 왔으며, NF κ B 저해제는 항암제 내성을 극복할 수 있는 새로운 수단으로 사용되어져 오고 있다(Sarkar FH, et al., 2008).

또한, NF κ B의 과도한 활성화는 암세포의 세포자기사멸을 통한 사멸에 대한 저항성을 부여하고, 오히려 세포증식을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Beg AA, et al., 1996, Wang CY, et al., 1998). 정상세포에 NF κ B를 과발현 시킬 경우 마치 종양세포와 유사한 표현형으로 바뀌는 경우도 관찰되었다고 한다.

TNF는 염증반응에 있어서 활성화된 대식세포와 T세포에 의하여 주로 생산되는 cytokine이며(Tartaglia LA, et al., 1993), 전사인자인 NF κ B와

JNK/AP-1을 활성화하여 pro-inflammatory와 면역조절 유전자들을 유도하고 anti-apoptotic 유전자를 유도하는 것으로 알려져 있다(Beg AA, et al., 1995, Liu Z, et al., 1996).

NF κ B 전사인자군은 여러 가지 sub-unit로 구성된 homo- 또는 heterodimeric 이중합체들로서 이루어진다(Miyamoto S, et al., 1995, Verma IM, et al., 1995, Gilmore TD, et al., 1993). 이 군에 속하는 전사인자들은 모두 v-rel viral oncoprotein 과 그 cellular homologue 인 c-rel 에 구조적으로 연관되며 또한 DNA에의 결합과 이중합체 형성에 필요한 domain을 가진다는 공통점을 갖는다(Ballard DW, et al., 1990, Bose HR, 1992, Walker WH, et al., 1992, Wilhelmssen KC, et al., 1984).

활성화된 NF κ B는 p50과 p65로 불리는 두 가지 하위구조단백질로 구성된 이중합체가 가장 대표적으로 알려져 있다. 또한 그 활성화는 세포내에서의 위치관계(subcellular localization)에 의하여 결정된다. 이 물질은 세포질 내에서 억제인자인 I κ B 단백질과 결합한 비활성화형태 dormant complex로 존재한다(Baeuerle PA, et al., 1988, Baeuerle PA, et al., 1989).

여러 가지 다양한 세포외의 자극에 의하여 I κ B가 분리되면 유리된 NF κ B는 복합체의 형태로 세포핵내로 이동하여 NF κ B에 결합하는 특이 DNA sequence(κ B motif)에 결합함으로써 목표 유전자(target gene)의 전사활성을 조절하게 된다. 이 같은 NF κ B의 활성화에 따른 전사 산물에는 각종염증 유발성 사이토카인 NOS나COX-2 등의 염증성 효소 세포 부착분자들 IL-2 및 T림프구의 수용체 등이 포함 된다(Barnes PJ, et al., 1997).

3) Proteasome

Proteasome은 세포질 속에 있는 효소로 NF κ B가 세포질에 p50/p65 이질 이량체(heterodimer)로서 존재하며 I κ B α 의 결합으로, 억제되어 있는 상태로

존재하는 데 inducer에 의하여 자극이 되면 protein kinase에 의하여 I κ B α 의 인산화가 이루어지게 되고 ubiquitin과 conjugation 된 후에 단백질분해효소복합체(protease complex)인 proteasome에 의하여 I κ B α 의 분해(degradation)가 이루어지고 이량체의 p50/p65가 핵으로 이동하여 DNA의 특정 부위에 결합하여 전사를 유도하게 되는 데(Figure 2. Yoon HG, et al., 2007) peptidyl aldehyde인 MG-132(N0acetyl-L-leuciny-L-leucinal-L-leusinal)는 가역적인 proteasome 억제제로서 NF κ B의 활성을 억제하며, 이는 NF κ B에 의하여 유도되는 염증반응계의 물질 발현을 억제하며, TNF- α , 방사선, daunoubicin 등에 의한 apoptosis를 강화시킨다(Wang CY, et al., 1996).

본 연구는 사과 농축액을 이용하여 인간 폐암세포에서 proteasome의 변화를 살펴보고자 한다.

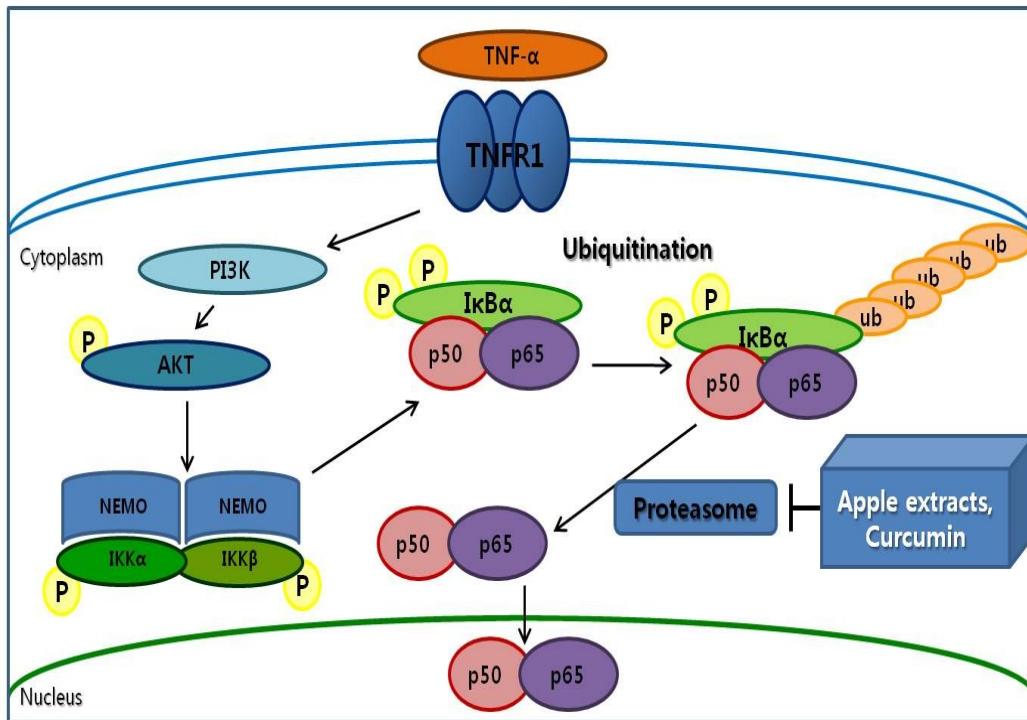


Figure 2. Proposed mechanism of apple extracts to inhibit TNF- α -induced NF κ B activation in MCF-7 human breast cancer cell

(Modified from original image from Yoon HG, et al., 2007)

Apple extracts inhibit proteasome that degrades ubiquitinated I κ B α to release NF κ B. TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TNFR1, TNF receptor 1; PI3K, phosphatidylinositol 3'-kinase; MEKK3, mitogen-activated protein kinase/extracellular signalregulated kinase kinase 3; NEMO, NF κ B essential modulator; I κ B α , inhibitor of NF κ B; IKK, I κ B α kinase; P, phosphate; ub, ubiquitin.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구는 인간 폐암세포로 A549 cell을 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지인 F-12K 배지와 소의 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO사 제품을 구입하여 사용하였다. 배지에 첨가된 항생제인 Penicillin+Streptomycin과 Trypsin-EDTA, Trypan blue, dimethyl sulfoxide, DMSO)은 Sigma사 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 사과(부사)는 국내 대형마트에서 구입 하였다. Quercetin 3- β -D glucoside(Q3G), paclitaxel, cisplatin, TNF- α 와 Western blot 분석에 필요한 12% SDS-PAGE gel의 시약 및 그 외 연구에 사용된 대부분의 시약들은 Sigma사 (Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

NF κ B p65 항체(Antibody) (mouse monoclonal), β -actin은 Santa Cruz Biothechnology(Santa Cruz, CA)제품을 사용하였으며, I κ Ba 항체 (mouse monoclonal), phospho I κ Ba(Ser32/36), Anti-mouse IgG 는 Cell Signaling(Danvers, MA)에서 구입하여 사용하였다. NF κ B의 marker로 사용된 nucleolin은 millipore에서 구입하여 사용하였다. 또한 detection에 필요한 ECL solution 은 PicoEPL을 사용하였고, Hyperfilm, Developer와 Fixer 는 Amersham-Pharmacia에서 구입하여 사용하였다.

2. 연구방법

1) A549 세포의 배양

인간 폐암세포인 A549 cell은 한국생명공학연구원(Korean Research Institute of Bioscience and Botechnology, KRIBB, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 그 분양조건은 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% Penicillin+Streptomycin을 첨가한 F-12K배지를 세포 배양 Flask(T 25cm², T 75cm²)에 부유하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo, Model No. 371)에서 배양하여 이용하였다. 배지는 3-4일에 한 번씩 교환하였고, 5-6일간 배양한 뒤 Trypsin-EDTA로 처리하여 1:3으로 계대 배양 하였다. 실험에 사용한 세포는 20회 이상의 계대배양은 하지 않았다.

세포의 동결은 배양이 끝난 Flask의 배지를 제거한 후 PBS로 두 번 세척하고, Trypsin-EDTA로 세포를 떼어주고 계수하여 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cell/mL 이 되도록 하고 5% DMSO를 첨가하여 Cyro tube에 1mL씩 분주하여 이를 -20°C에서 100분, -80°C에서 24시간 동안 보관하였다가 -180°C이하의 액체 질소 탱크에 넣어 장기 보존하였다.

2) 사과 농축액 제조

사과 농축액은 선행연구를 참고하여 제작하였다(Wolfe, K et al., 2003, Dewanto, V. et al., 2002). 그 제조과정은 Figure 3에 나타내었다.

사과(부사) 100 g을 미리 냉각시켜둔 200 mL의 80% acetone(v/v)과 함께 5분간 blender로 조심스럽게 갈아준 다음 homogenizer(대일랩서비스, Tops)로 3 분 간 갈아주었다. Aspirator(GAST Manufacturing, Model No. DOA-P704-AC)를 이용하여 No. 2 whatman 여과지로 여과하였다. 여과액을 회전 증발 농축기(EYELA, Rotary Vacuum Evaporator Model No. N-N Series, CCCA-1111)를 이용하여 45℃에서 약 90% 정도를 증발시키고 여기에 여과된 증류수를 넣어 2 g/mL 농도의 사과 농축액을 만들었다. 최종 만들어진 2 g/mL 농도는 1 mL 안에 전체 사과 100 g 중 2 g의 성분이 함유되어 있음을 나타내는 것이다. 이렇게 얻은 사과 농축액은 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

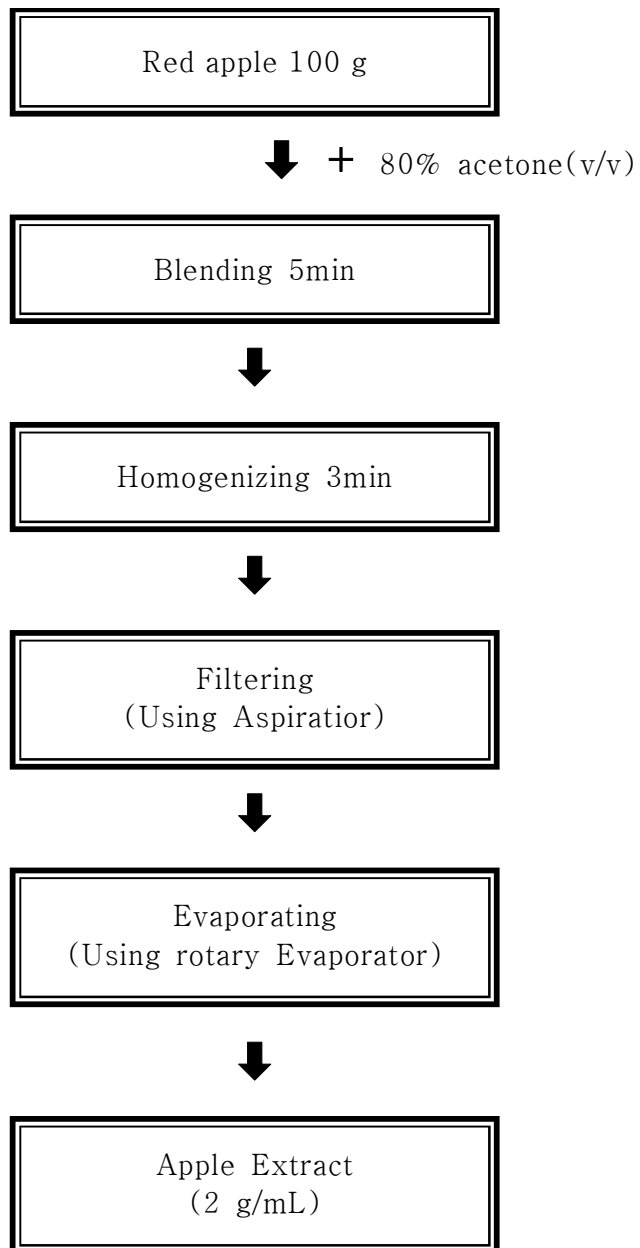


Figure 3. Process of red apple extract

3) 세포 독성을 측정 (Cytotoxicity)

처리물질의 세포독성을 확인하는 Methylene blue법은 선행연구를 참고하여 실행하였다(Oliver MH, et al., 1989).

96-well plate에 세포독성을 보고자 하는 경우에는 A549cell을 6×10^4 cell/well로, 세포증식을 보고자 하는 경우에는 A549cell을 4×10^4 cell/well로 200 μ L/well씩을 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Thermo, Model No. 371) 안에서 24시간 배양해준 다음 농도별 사과 농축액 및 Q3G를 넣은 배지로 세포독성은 100 μ L/well씩, 세포증식은 200 μ L/well씩 교환하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo, Model No. 371) 안에서 각각 24시간, 96시간을 배양해준 후 PBS 100 μ L/well씩 넣고 씻어주고 Methylene blue staining solution [Hanks Balanced Salt Solution(HBSS) 98%, glutaraldehyde 1.25%, Methylene blue 0.6%]을 넣고 37°C에서 1시간 두어 염색하였다. 증류수로 색이 씻겨 나오지 않을 때까지 씻고 plate를 말려준 후 elution buffer [PBS 49%, ethanol 50%, acetic acid 1%]를 넣고 상온에서 1시간 동안 waving shaker((Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반 시켜준 다음 plate reader기(BIOLOG, Precision microplate reader E10205, USA)에서 590nm로 찍어 흡광도를 확인 하였다. 측정된 흡광도 o.d. 값을 다음의 식에 대입하여 세포독성에 대한 백분율을 구하였다.

$$Cytotoxicity(\%) = \frac{control\ absorbance - sample\ absorbance}{control\ absorbance} * 100$$

4) 세포 증식을 측정 (Cell Proliferation)

처리물질의 세포증식 변화를 확인하는 MTT법은 선행연구를 참고하여 실행하였다(Liu M, et al., 2002).

MTT법은 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사 방법이다.

96-well plate에 세포독성을 보고자 하는 경우에는 A549cell을 6×10^4 cell/200 μ L/well로, 세포증식을 보고자 하는 경우에는 A549cell을 4×10^4 cell/133 μ L/well로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo, Model No. 371) 안에서 24시간 배양해준 다음, 농도별 사과 농축액 및 Q3G를 넣은 배지로 세포독성은 100 μ L/well씩, 세포증식은 200 μ L/well씩 교환하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo, Model No. 371) 안에서 각각 24시간, 96시간을 배양해준 후 MTT solution[0.5 mg/mL 농도로 MTT를 녹인 배지]을 넣고 37°C에서 4시간 둔 다음 Acid-isopropanol [0.04 N 농도로 HCl을 넣은 isoprophanol]을 넣고 20시간 동안 waving shaker((Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반 시켜준 다음 plate reader기(BIOLOG, Precision microplate reader E10205, USA)에서 590nm로 찍어 흡광도를 확인 하였다. 측정된 흡광도 o.d. 값을 다음의 식에 대입하여 세포증식에 대한 백분율을 구하였다.

$$Cell\ Proliferation(\%) = \frac{sample\ absorbance}{control\ absorbance} * 100$$

5) 식물유래유용물질과 TNF- α 의 처리

A549 세포를 6-well plate에 한 well당 5×10^5 cell로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo, Model No. 371)에서 24시간동안 배양하였다. 세포에 물질을 처리하기 전에 멸균한 PBS로 씻어주고, FBS가 첨가되지 않은 F-12K배지에 사과 농축액 또는 Quercetin 3- β -D glucoside(Q3G)를 농도별로 첨가하여 처리하고 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo, Model No. 371)에 두었다. Western Blot용 cell은 2well씩 같은 농도로 처리하여주고, proteasome activity용 Cell에서 2시간 뒤 처리한 농도별 배지를 제거하고 멸균한 PBS로 씻어주고 10 ng/mL 농도의 TNF- α 를 넣어주어 30분 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo, Model No. 371)에 두었다. 위의 처리과정은 Figure 4에 나타내었다.

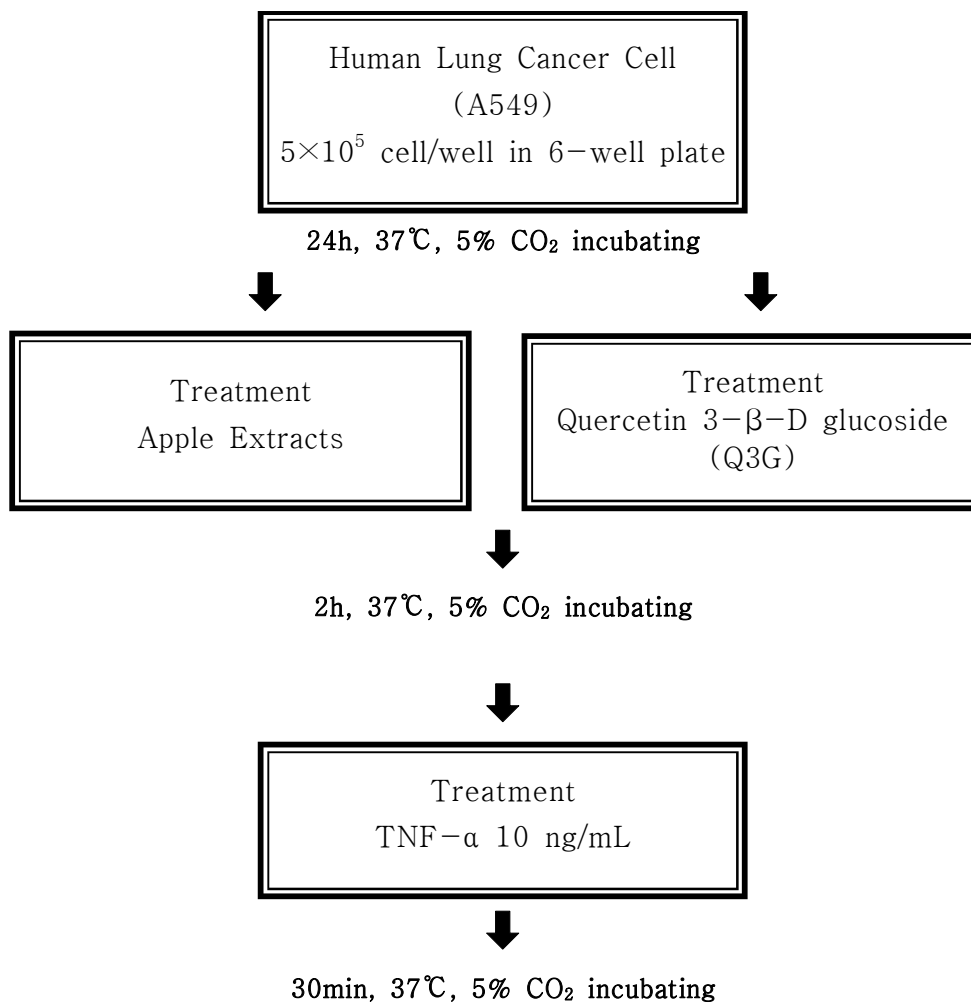


Figure 4. Process of Apple Extracts and Quercetin 3-β-D glucoside(Q3G) Treatment

6) 핵 추출물(Nuclear Extract)과 세포질 추출물(Cytosolic Fraction)의 획득

핵 추출물과 세포질 추출물은 선행연구를 참고하여 준비하였다 (Pozo-Guisado E, et al., 2005, Janssen YMW, et al., 1999, Nakajima H, et al., 2004)

세포는 차가운 PBS로 2번 씻어주고 얼음위에서 scraper를 이용하여 세포를 떼어낸 후 4°C 원심분리기(Gyrozen, Model No. 1580MGR)에서 130×g로 5분간 돌려주었다. cell down 시켜 얻은 pellet은 차가운 hypotonic buffer[10 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 0.4 mM PMSF, 1 mM dithiothreitol, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin]와 섞어 현탁액을 만들어 주고 얼음에서 15분 둔 후 10% IGEPAL (Sigma-Aldrich Co.)을 넣어 vortexer(Theromolyne, Model No. M37610-26)에서 15초간 돌려주었다.

이렇게 만든 세포 현탁액을 4°C 원심분리기(Gyrozen, Model No. mini)에서 12000×g로 3분간 돌려주고, 상등액인 세포질 추출물은 따로 모아 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다.

상등액을 제거하고 남은 핵 pellet에 차가운 high-salt extraction buffer[50 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 0.4 mM PMSF, 1 mM dithiothreitol, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin]를 넣어 4°C에서 30분간 waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반시켜주어 핵막을 깨주었다.

4°C 원심분리기(Gyrozen, Model No. mini)에 옮겨 12000×g에서 30분간

들려준 후 핵 추출물을 소량씩 분주하여 사용하기 전까지 -80°C 에 보관하였다. 위의 시료 획득과정은 Figure 5와 Figure 6에 나타내었다.

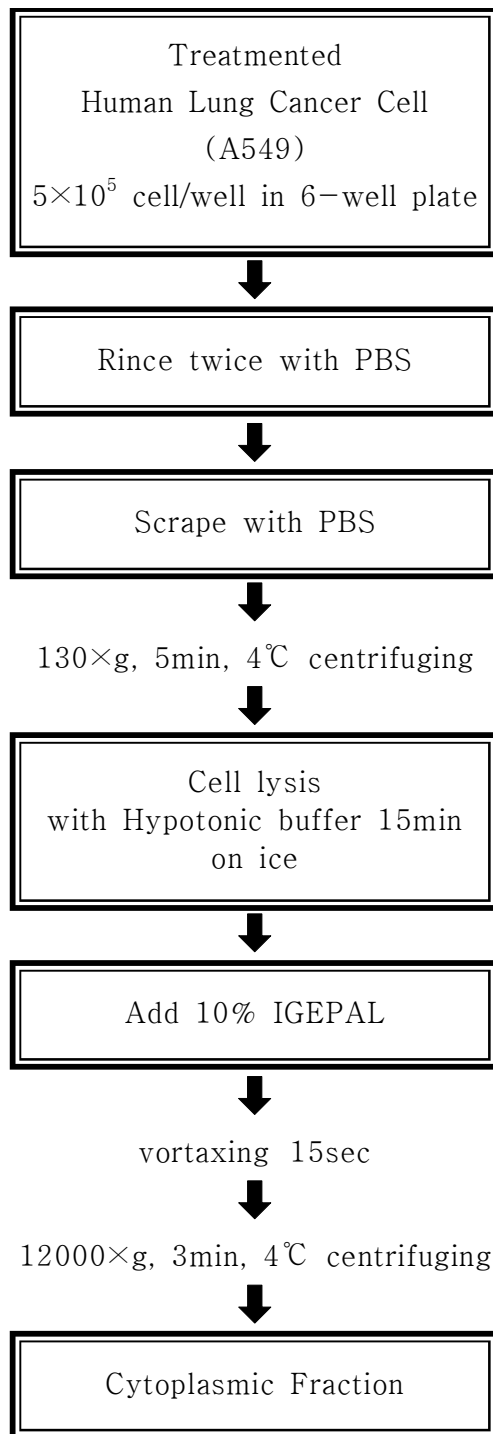


Figure 5. Process of Cytoplasmic Fraction preparation

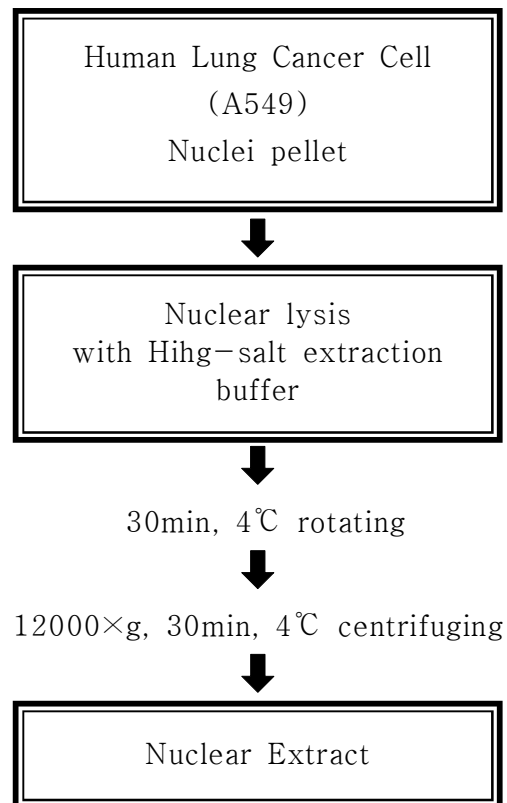


Figure 6. Process of Nuclear Extract preparation

7) Western Blotting

처리물질의 특정 단백질을 확인하는 Western Blot법은 선행연구를 참고하여 실행하였다(Liu RH, et al., 1997, Sun J, et al., 2008).

시료의 단백질 정량은 DC Protein Kit I (BIO-RAD)을 사용하였으며, 각 시료는 같은 단백질 mg수로 용량을 계산하여 2× sample buffer(Sigma-Aldrich, USA)를 시료와 1:1로 섞어 전처리하였다. 각 시료를 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 다음 Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Billerica, MA)에 단백질을 옮겨주고 3% nonfat dry milk-PBS (w/v)로 4℃에서 1시간 동안 waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반하며 blocking 시켜주었다. membrane을 1차 항체 NFκB (1:1000), Anti-nucleolin (1:1000)과 함께 4℃에서 24시간 waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반해준 후에 3% nonfat dry milk-PBS에 2차 항체 Anti-mouse IgG (1:1000), Anti-biotin (1:1000)과 함께 상온에서 2시간 waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반 시켜주었다. membrane에 ECL 기질(PicoEPD substrate solution)을 1분간 처리하고 암실에서 Amersham Hyperfilm (GE Healthcare)에 현상하였다.

8) Proteasome 활성 측정

세포질 내 proteasome 활성 측정 방법은 선행연구를 참고하여 실행하였다(Place RF, et al., 2005).

미리 준비해둔 cytosolic fraction에 시료별로 계산한 reaction buffer [25 mM HEPES, 500 μ M EDTA, pH 7.6]를 넣어주고, proteasome 억제제인 MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, Sigma-Aldrich Co.)를 1 μ M농도로 넣어주고 37°C에서 5분 동안 둔 다음 각 시료에 proteasome substrate III를 50 μ M농도로 넣어주고 37°C에서 60분 동안 두었다. 이때 최종 양은 reaction buffer로 조절하여 1 mL로 맞추어주었다. 형광계(Quantech, Model No. FM 109510-33)에서 excitation 355(360)nm, emission 460(512)nm로 proteasome의 활성을 확인하였다.

9) 통계처리

본 연구의 결과는 적어도 3번 반복하여 평균(\pm 표준편차)를 구한 값으로 사용하였다. 각 항목에 따른 자료 분석은 SAS 9.1(Statistical Analysis System, Version 9.1, SAS Institute INC., USA) 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하여 처리물질의 농도변화에 따른 유의성을 검토하였다. 또한 유의성이 있는 경우 차이검증을 위해 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검증을 하였다.

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

1. 세포독성율(Cytotoxicity) 및 세포증식율(Cell Proliferation)의 변화

세포독성율(Cytotoxicity)은 처리 물질인 사과 농축액과 Q3G 자체의 농도별로 세포에 24시간 처리하여 하루 동안에 시료가 세포에 급성독성을 나타내는 지 아닌지를 확인하는 실험방법으로 세포독성이 10% 미만으로 나타나는 농도를 사과 농축액 및 Quercetin 3-β-D glucoside(Q3G)가 세포에 급성독성을 미치지 않는다고 보았으며 10% 미만의 세포독성 농도를 최대 농도로 선택하였다.

세포증식율(Cell Proliferation)은 96시간 동안 시료를 세포에 처리하여 시료에 의한 세포의 증식 변화를 확인하는 실험방법으로 세포증식율의 감소가 나타나는 범위의 농도를 선택하여 실험하되 세포독성이 10% 미만으로 나타난 농도 범위를 기준으로 하였다. 세포독성율 및 세포증식율의 실험 결과는 Figure 7과 Figure 8에 그래프로 나타내었다.

그 결과 사과 농축액을 처리한 세포의 경우 50 mg/mL 이하의 농도에서 10%미만의 독성율을 나타냈고 60-200 mg/mL의 농도에서는 11.7-47.7%로 독성율이 증가하였고 Q3G를 처리한 세포의 경우 10%미만의 독성율을 나타낸 농도는 130 μM 이하였으며 10% 이상의 독성율을 보인 10, 160, 200 μM 농도에서도 14.4, 10.9, 16.2%의 독성을 나타낸 것으로 보아 사과 농축액 보다 비교적 독성률은 낮다고 할 수 있다.

그래서 사과 추출물은 50 mg/mL이하, Q3G는 100 μM이하의 농도가 세포 독성이 10% 미만이면서 세포증식 저해가 있는 것으로 나타났기에 각각의 물질 처리 농도를 정하여 실험을 진행하였으며 농도는 Table 4에 나타낸 것과 같다.

세포의 증식은 사과 농축액을 처리한 세포의 경우 10, 20 mg/mL의 농도에서 약간 증가하는 경향을 보이다가 40 mg/mL 이상의 농도부터는 농도가 증가 할수록 감소되었고, 세포증식율에 대한 감소 효과는 60 mg/mL 이상의 농도부터 유의적인 것으로($p < 0.0001$) 나타났다. Q3G를 처리한 세포의 경우 전체적으로 증식의 감소가 나타났으며 통계 분석을 실시 한 결과 처리 농도 전체에서 유의성($p < 0.0001$)이 있는 것으로 확인 되었다.

이는 사과 농축액이 과일에서 직접 추출한 것으로 여러 가지 성분이 함유되어 있어 여러 경로가 작용했을 것으로 생각 되며, Q3G는 compound로 몇 가지 단계만이 작용하여 위와 같은 결론이 나타난 것으로 사료된다.

위의 결과로 A549 폐암세포 내에서 사과 농축액과 Q3G성분을 통한 증식 억제 효과를 확인 할 수 있었다.

Table 4. Sample Concentration of Red Apple Extract and Quercetin 3- β -D glucoside

Sample	Concentration				
Red Apple Extract (mg/mL)	0	5	10	20	50
Quercetin 3- β -D glucoside (uM)	0	5	10	50	100

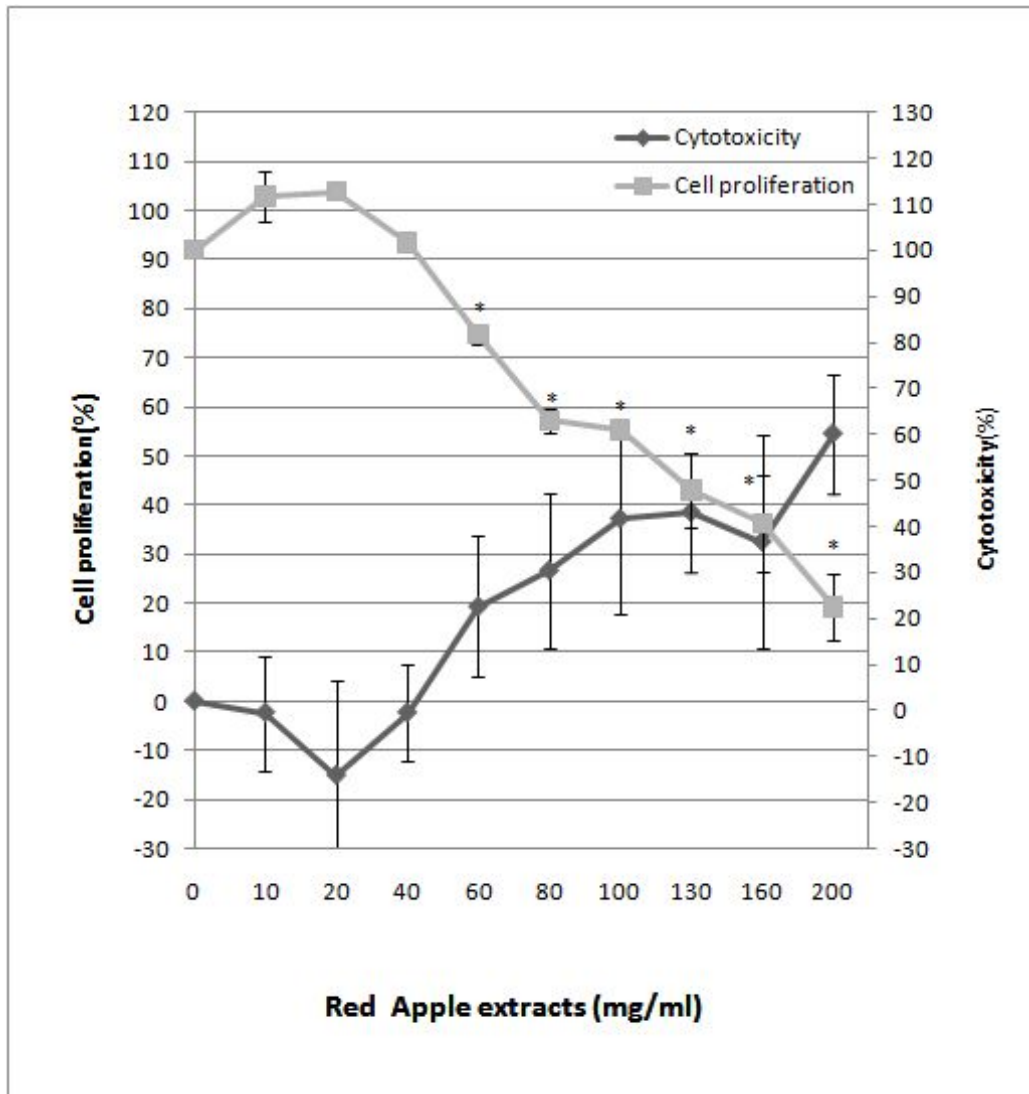


Figure 7. Effect of red apple extracts on cytotoxicity and cell proliferation in A549 cells.

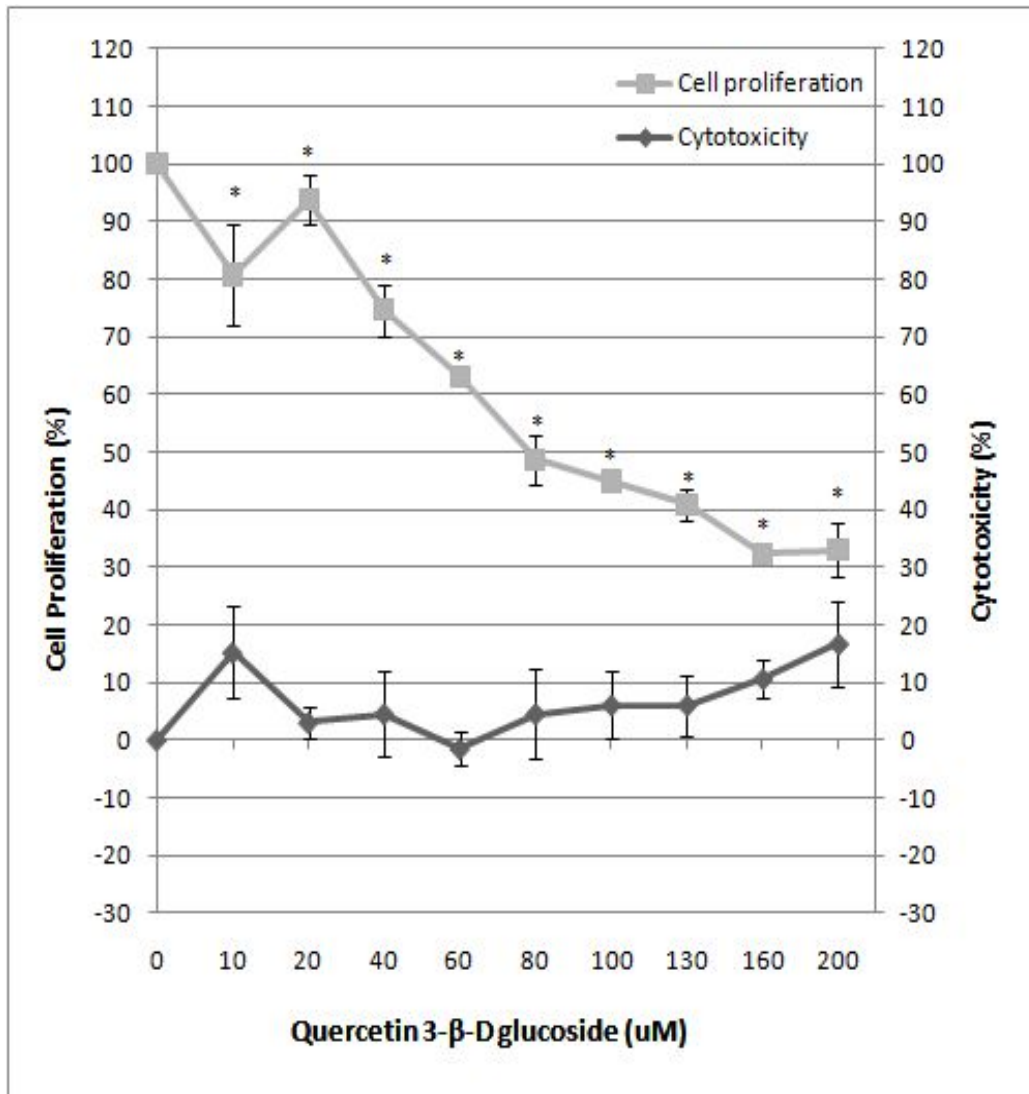


Figure 8. Effect of Quercetin 3-β-D glucoside on cytotoxicity and cell proliferation in A549 cells.

2. NFκB의 발현 변화

A549 폐암세포에 사과 농축액 처리 후 TNF-α를 통해 NFκB를 활성화 시킨 변화는 western blot 실험법에 의해서 확인하였으며 그 결과는 Figure 9와 Figure 10에 나타내었다.

암 발현에 관여하는 전사인자인 NFκB를 최대한 측정하기 위해 TNF-α의 처리로 과 발현 시켜 NFκB의 핵 내 유입을 유도하였고 특정 단백질을 band 형태로 볼 수 있는 western blot 실험법을 이용하여 측정한 값을 Image J로 분석하여 핵 내 측정 기준이 되는 nucleolin으로 band 정량 값 대비 NFκB의 band 정량 값으로 계산하여 수치화 하여 비교한 결과이다.

사과 농축액을 처리한 A549 폐암 세포의 경우, NFκB의 핵 내 유입을 억제하는 것으로 나타났다. 사과 농축액 5 mg/mL에서는 다소 증가하는 경향을 나타내었으나 처리농도가 10, 20, 50 mg/mL로 증가 되면서 band가 나타나지 않았으며, 그 정량 결과 NFκB의 발현 값이 0%로 나타났으며 통계 처리 결과 유의적으로($p < 0.0001$) 감소하였다.

폐암세포에 Q3G 처리 후 TNF-α를 통해 NFκB를 활성화 시킨 효과는 western blot 실험법에 의해서 확인하였으며 그 결과는 Figure 11과 Figure 12에 나타내었다.

Q3G를 처리한 A549 폐암세포의 경우, 시료에 의해 5, 10, 100 μM농도에서 NFκB가 0 μM에 비해 소폭 증가하는 경향을 나타내었고 50 μM의 농도에서 감소를 나타내었지만 큰 차이가 없는 것으로 나타나 본 연구에서는 Q3G가 NFκB의 핵 내 유입을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

이는 Yoon 등 (Yoon HG, et al., 2007)의 결과에서도 Quercetin dihydrate에서는 NFκB 감소가 보였지만 Q3G에서는 뚜렷한 결과가 보이지 않은 것과 비슷한 양상을 보인다.

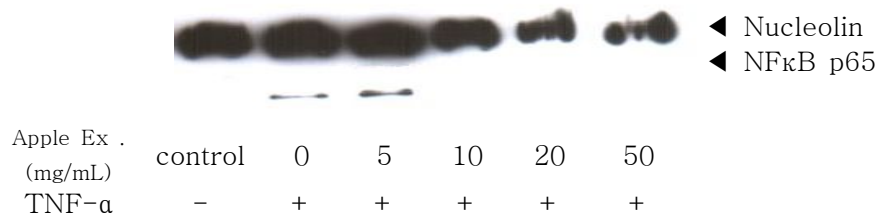


Figure 9. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced NF κ B activation in A549 cells.

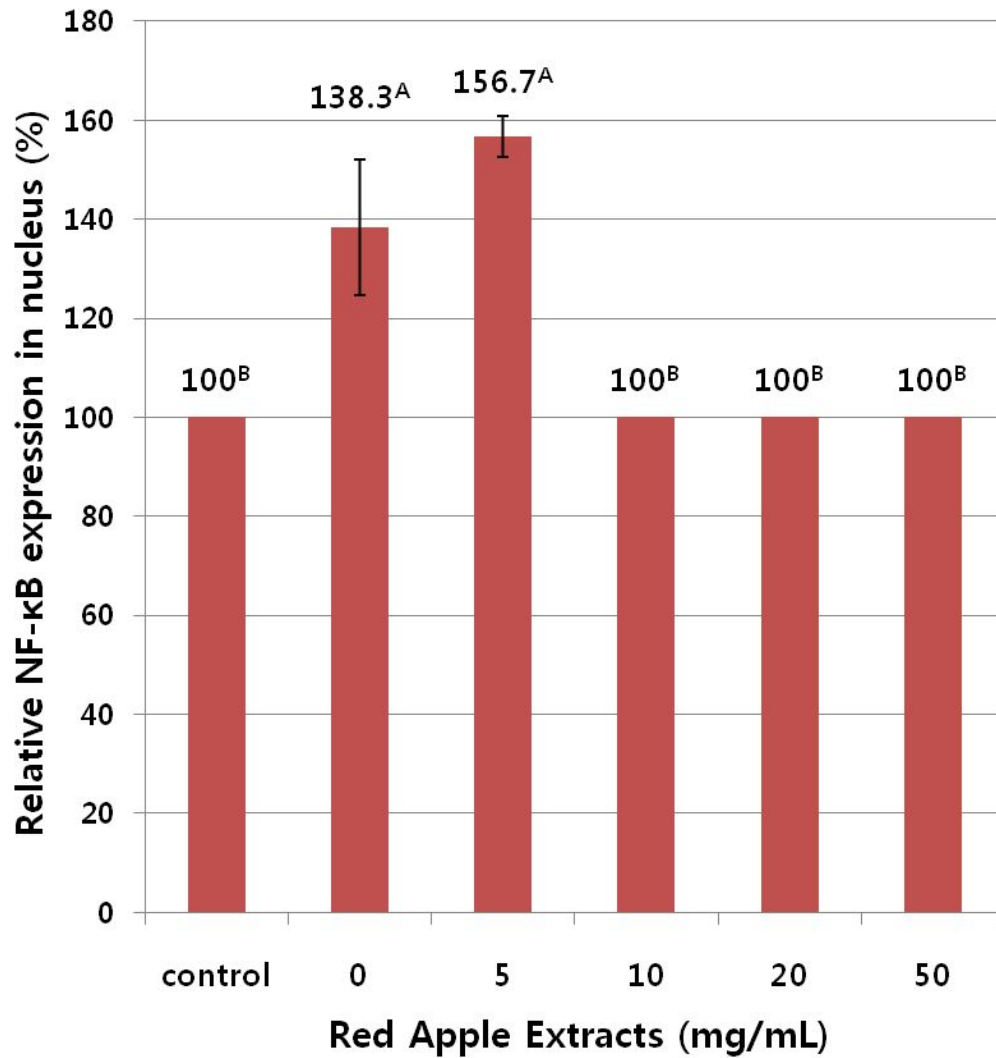


Figure 10. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced NF κ B activation in A549 cells.

* Each letters indicate significant difference ($p < 0.0001$, mean \pm SD, $n = 3$)

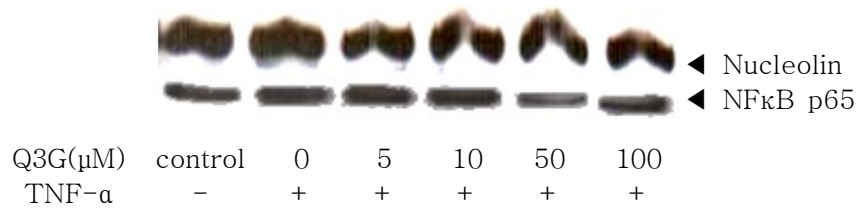


Figure 11. Effect of Quercetin 3-β-D glucoside(Q3G) on TNF-α-induced NFκB activation in A549 cells.

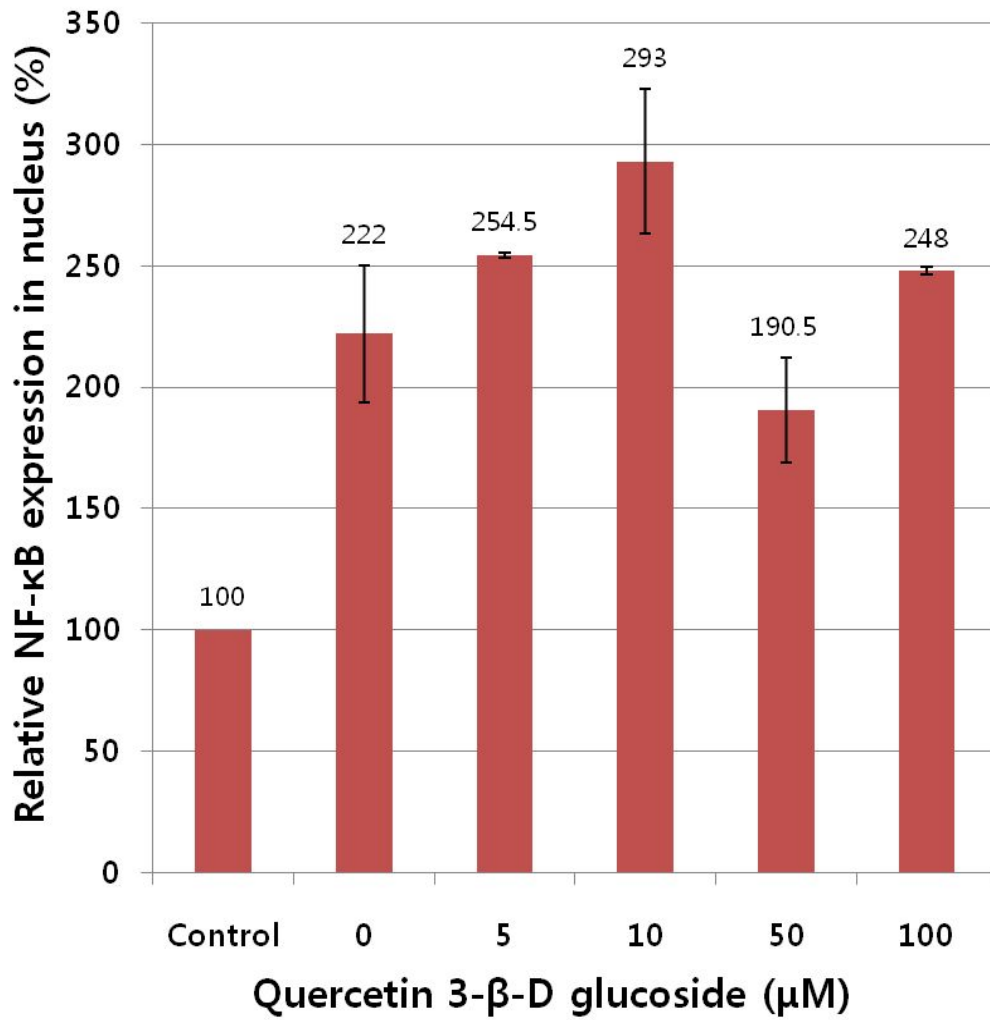


Figure 12. Effect of Quercetin 3-β-D glucoside(Q3G) on TNF-α-induced NFκB activation in A549 cells.

* mean ± SD, n=2

3. P-IκBa의 발현 변화

A549 폐암세포에 사과 농축액 처리 후 TNF-α를 통해 p-IκBa를 활성화시킨 변화는 western blot 실험법에 의해서 확인하였으며 그 결과는 Figure 13과 Figure 14에 나타내었다.

IκB는 NFκB와 결합된 상태로 세포질 내에서 NFκB가 비활성화형태(dormant complex)로 존재하게 하는 억제인자로 작용한다.

이 IκB가 여러 가지 다양한 세포 외의 자극에 의하여 IκB가 분리되면, 유리된 NFκB는 복합체의 형태로 세포핵 내로 이동하여 NFκB에 결합하는 특이 DNA sequence(κB motif)에 결합함으로써 목표유전자(target gene)의 전사활성을 조절하게(Baeuerle PA et al., 1988, Baeuerle PA et al., 1989) 되는데, NFκB와 결합하여 있다가 인산화가 되면 p-IκBa가 되고 NFκB가 분리되어 핵 내로 유입되게 되는데 이때의 p-IκBa 정도를 측정하는 것이다.

이 p-IκBa를 최대한 측정하기 위해 TNF-α의 처리로 과 발현 시켜 p-IκBa의 활성을 유도하였고 특정 단백질을 band 형태로 볼 수 있는 western blot 실험법을 이용하여 세포질에 존재하는 p-IκBa를 측정하는 값을 Image J로 분석하여 세포질 내 측정 기준이 되는 β-actin으로 band 정량 값 대비 p-IκBa의 band 정량 값으로 계산하여 수치화 하여 비교한 것이다.

Q3G의 처리는 앞선 NFκB의 결과를 확인하였을 때 뚜렷하게 NFκB를 억제하지 못하는 것으로 나타나 NFκB의 전 단계인 IκB가 인산화 되는 것 역시 억제하지 못하는 것으로 판단되어 사과 농축액의 p-IκBa의 변화만을 살펴보았다.

사과 농축액을 농도별로 처리한 A549 폐암세포에서 p-IκBa는 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. western blot 실험을 통해서 나타난 결과를 살펴보면 p-IκBa가 감소되어 가는 것을 확인 할 수 있고, 이

를 정량하여 수치화한 결과를 살펴보면 5 mg/mL의 농도에서 증가하는 것으로 나타나다가 10 mg/mL의 농도부터는 농도가 증가 할 수 록 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 통계 분석 결과에서 0.05이하 수준의 유의성 ($p=0.0301$)이 확인 되었다.

이를 통하여 사과 농축액의 영향으로 I κ B가 인산화 되는 것을 억제하여 A549 폐암세포의 증식억제가 나타난 것으로 해석된다.

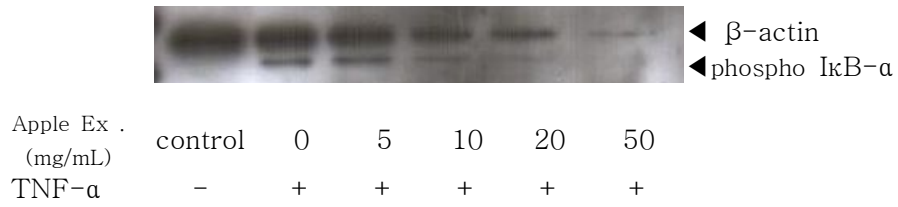


Figure 13. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced phospho I κ B α activation in A549 cells.

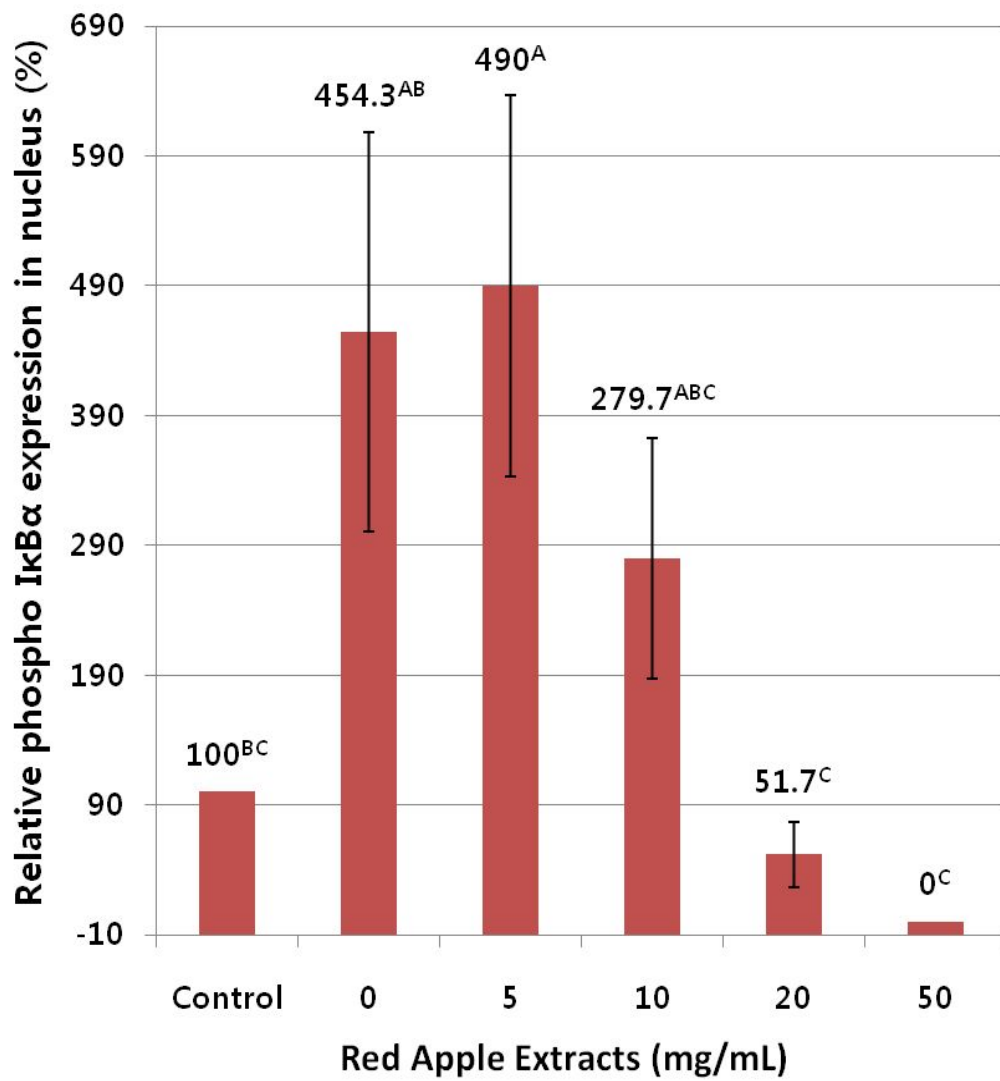


Figure 14. Effect of red apple extracts on TNF- α -induced phospho IκB α activation in A549 cells.

* Each letters indicate significant difference ($p < 0.05$, mean \pm SD, $n = 3$)

4. Proteasome 활성

사과 농축액을 농도별로 처리하여 세포질 내 proteasome의 활성을 측정한 결과는 Figure 15와 같다.

사과 농축액을 처리하여 얻은 세포질의 proteasome 활성은 형광계를 사용하여 측정하였다. 사과 농축액의 농도가 증가 할수록 proteasome의 활성은 감소하는 경향을 나타내었고 특히, 사과 농축액을 50 mg/mL 농도로 폐암세포에 처리한 시료에서 11.3 %로 가장 낮은 proteasome의 활성을 보였다. 통계 처리한 결과에서는 유의적($p < 0.0001$)으로 감소하는 것으로 나타났다.

사과 농축액을 처리한 인간 유방암세포(MCF-7)의 경우(Yoon, Hyun Geun, Rui Hai Liu. 2007), 사과 농축액의 처리 농도가 증가 할수록 proteasome의 활성이 유의적으로 감소하였다고 하였다.

Q3G를 농도별로 처리하여 세포질 내 proteasome의 활성을 측정한 결과는 Figure 16과 같다.

Q3G를 처리하여 얻은 세포질의 proteasome 활성은 0 μ M과 비교하여 Q3G의 농도가 5, 10, 50, 100 μ M로 증가 할수록 50%내외의 활성이 나타났으며 그 중 50 μ M에서 48%로 비교적 가장 낮은 proteasome의 활성 감소를 보였다. 통계 처리한 결과에서는 유의적인 결과가 $p = 0.0914$ 로 나타났다.

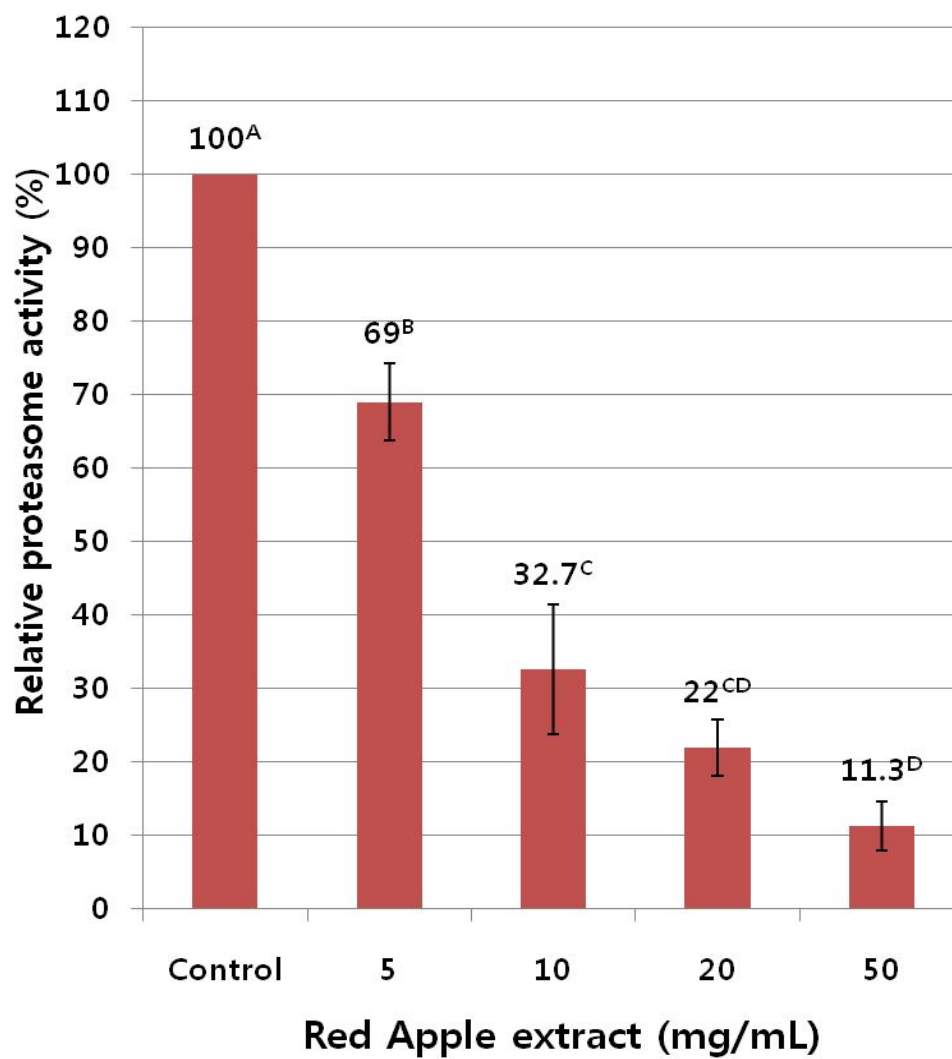


Figure 15. Effect of red apple extracts on proteasome activity in A549 cells.

* Each letters indicate significant difference ($p < 0.0001$, mean \pm SD, $n=3$)

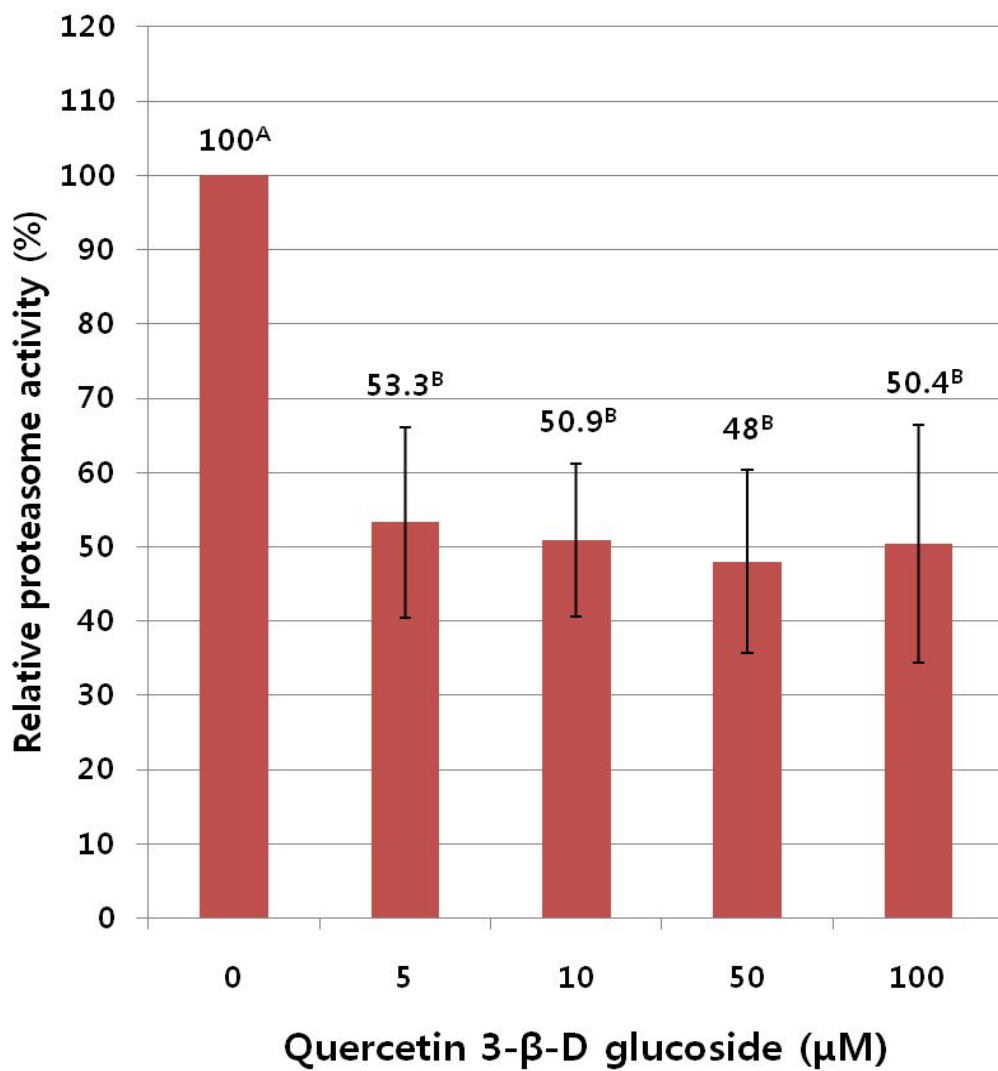


Figure 16. Effect of Quercetin 3-β-D glucoside on proteasome activity in A549 cells.

* Each letters indicate difference (p=0.0914, mean ± SD, n=3)

IV. 결론

본 연구는 인간 폐암 세포인 A549 세포에서 사과 농축액과 Quercetin 3- β -D glucoside(Q3G)에 의한 세포 성장 억제 기전을 연구하였다. 세포 성장 억제 기전의 지표로서 Nuclear factor- κ B(NF κ B)와 Phospho-I κ Ba(p-I κ Ba)의 변화를 알아보기 위해 TNF- α 를 처리하여 NF κ B의 핵 내 유입을 유도하여 사과 농축액과 Q3G를 각각 0, 5, 10, 20, 50 mg/mL, 0, 5, 10, 50, 100 μ M 농도로 처리하였을 때 세포증식율에 미치는 영향, NF κ B의 함량 변화, p-I κ Ba의 함량 변화, NF κ B의 핵 내 유입 유도 효소인 proteasome의 활성 억제 정도 등을 분석하였다.

1. 세포의 독성은 10%미만의 독성율을 나타낸 농도를 세포에 급성독성을 미치지 않는다고 보았으며 사과 농축액을 처리한 세포의 경우 40 mg/mL 이하의 농도에서 10%미만의 독성율을 나타냈고 60-200 mg/mL의 농도에서는 11.7-47.7%로 독성율이 증가하였다. Q3G를 처리한 세포의 경우 10%미만의 독성율을 나타낸 농도는 130 μ M 이하였으며 10% 이상의 독성율을 보인 10, 160, 200 μ M 농도에서도 14.4, 10.9, 16.2%의 독성을 나타낸 것으로 나타났다.

세포의 증식은 사과 농축액을 처리한 세포의 경우 10, 20 mg/mL의 농도에서 증가하는 경향을 보이다가 40 mg/mL 이상의 농도부터는 농도가 증가할수록 감소되었고, Q3G를 처리한 세포의 경우 전체적으로 증식의 감소가 나타났다.

이를 통하여 사과 농축액 및 Q3G가 A549 인간 폐암세포에 증식 억제 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

2. 사과 농축액을 통한 A549 폐암세포의 증식억제는 처리시료의 농도가 증

가 할수록 western blot법의 결과에서 NFκB가 5 mg/mL에서는 다소 증가하는 경향을 나타내었으나 처리농도가 10, 20, 50 mg/mL로 증가 되면서 band가 나타나지 않았으며, 그 정량 결과 NFκB의 발현 값이 0%로 나타났으며 통계 처리 결과 유의적으로($p < 0.0001$) 감소되는 경향을 보여, NFκB의 감소가 A549 폐암세포의 증식억제와 관련성이 있음을 확인할 수 있었다.

반면, Q3G를 처리한 A549 폐암세포에서는 western blot법을 통한 결과는 시료에 의해 5, 10, 100 μM 농도에서 NFκB가 0 μM에 비해 소폭 증가하는 경향을 나타내었고 50 μM의 농도에서 감소를 나타내었지만 큰 차이가 없는 것으로 나타나 본 연구에서는 Q3G가 NFκB의 핵 내 유입을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

3. 사과 농축액을 농도별로 처리한 A549 폐암세포에서 p-IκBa는 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. western blot 실험을 통해서 나타난 결과를 살펴보면 p-IκBa가 감소되어 가는 것을 확인 할 수 있고, 이를 정량하여 수치화한 결과를 살펴보면 5 mg/mL의 농도에서 증가하는 것으로 나타나다가 10 mg/mL 이상의 농도부터는 농도가 증가 할 수록 p-IκBa가 감소하는 것으로 사과 농축액은 IκBa가 인산화 되는 것을 억제하여 NFκB의 핵 내 유입이 감소되었다. 통계 분석 결과에서 0.05이하 수준의 유의성($p = 0.0301$)이 확인 되었다.

이를 통하여 사과 농축액의 영향으로 IκBa가 인산화 되는 것을 억제하여 A549 폐암세포의 증식억제가 나타난 것으로 해석된다.

4. 세포질 속에 있는 IκBa 분해 및 NFκB의 핵 내 유입 유도 효소인 proteasome은 사과 농축액의 농도가 증가 할수록 proteasome의 활성이 감

소하는 경향을 나타내었고 특히, 사과 농축액을 50 mg/mL 농도로 폐암세포에 처리한 시료에서 11.3%로 가장 낮은 proteasome의 활성을 보였고 유의적으로 감소하였다($p < 0.0001$).

반면 Q3G를 처리하여 얻은 세포질의 proteasome 활성은 0 μ M과 비교하여 농도가 5, 10, 50, 100 μ M로 증가 할수록 50%내외로 감소된 활성이 나타났으며 그 중 50 μ M에서 48%로 비교적 가장 낮은 proteasome의 활성 감소를 보였다. 통계 처리한 결과에서는 유의적인 결과가 $p = 0.0914$ 로 나타났다.

이를 통하여 사과 농축액이 proteasome의 활성을 억제함으로써 I κ B α 분해 및 NF κ B의 핵 내 유입 유도를 억제함에 따른 A549 인간 폐암세포의 증식 억제를 나타낸 것으로 해석된다.

결론적으로 사과 농축액의 처리는 폐암세포에서 세포 증식의 감소를 가져오는 것으로 확인되었고, proteasome의 활성 감소와 NF κ B, p-I κ B α 발현 감소를 확인함으로써 proteasome의 활성 감소를 통해 NF κ B의 핵 내 유입의 억제되는 결과를 볼 수 있었다. 폐암세포의 증식에서는 Q3G를 처리한 세포에서 증식감소도 나타나며 농도가 증가하여도 20%이하의 급성 독성을 나타나는 것으로 보아 사과에서 정제된 물질인 Q3G가 세포 증식 억제에는 효과적인 것으로 사료된다. 그러나 암의 발생, 세포의 증식, 분화, 세포 자기사멸, 염증반응 및 세포 내 신호전달계를 포함한 다양한 생물학적 반응의 중심적인 역할을 하는 전사조절인자인 NF κ B의 발현 감소와 이 NF κ B가 핵 내로 유입되는 것을 돕는 효소인 proteasome의 활성 감소를 보이는 것은 사과 농축액의 영향이 더 큰 것으로 나타나서 NF κ B억제를 통한 항 폐암에는 사과 농축액이 효과적인 것으로 사료된다. 하지만 사과의 성분 중에 잘 알려진 것이 Q3G인데 반해 Q3G의 일부 결과가 사과 농축액과는 다르게 나타난 것으로 보아 폐암세포의 억제 기작에서 사과의 영향이 quercetin의

영향인지의 상관관계가 불분명하므로 사과를 분획하여 사과 성분 중에서 폐암세포의 억제에 직접적인 영향을 미친 성분을 밝혀내고 그 기작을 확인하는 연구가 계속적으로 이루어질 필요성을 느끼며 더 나아가 사과를 이용한 항 폐암 기능성 식품 및 약제의 개발이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

이종혁. 폐암과 후두경부암에서 RAGE 유전자의 프로모터 6277에 위치한 단일 염기다형성과 전사 조절의 영향, 2004

정영원. 비소세포폐암에서 세포주기조절 유전자의 메틸화 상태 연구, 2010

조상원, 광기석, 이주향, 윤영수, 구연숙, 지청일, 이두석, 이양봉, 김선봉. 사과 추출물의 구취 억제 효과에 대한 Polyphenol Oxidase의 영향. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.30(6), 1301-1304, 2001

통계청. 1999-2009 사망원인통계. 2010

Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and Akt activation. Mol. Pharmacol. 69: 195-206, 2006

Akazome Y. Characteristics and physiological functions of polyphenols from apples. Biofactors 22: 311-314, 2004

American Cancer Society. 2010

Baeuerle PA, Baltimore D. A 65-kD subunit of active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by I κ B. Genes Dev 3:1689-98, 1989

Baeuerle PA, Baltimore D. I κ B : A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. Science. 242:540-6, 1988

Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. Annu Rev Immunol. 14: 649-681, 1996

Ballard DW, Walker WH, Doerre S, Sista P, Molitor JA, Dixon EP, Peffer NJ, Hannink M, Greene WC. The v-rel oncogene encodes a κ B enhancer binding protein that inhibits NF- κ B function. Cell 63:803-14, 1990

Barisic KJ, Petrik, and L. Rumora. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta. Pharm.* 53, 151–164, 2003

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B—A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 336:1066–71, 1997

Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science.* 274:725–784, 1996

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature,* 376:167–170, 1995

Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18: 1–29, 1992

Bose HR. The Rel family : models for transcriptional regulation and oncogenic transformation. *Biochim Biophys Acta* 1114:1–17, 1992

Colditz GA, Branch LG, Lipnick RJ, Willet WC, Rosner B, Posner BM and Hennekens CH. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population, *Am. J. Clin. Nutr.* 41:32–36, 1985

Dale AC, Alison LE, and John CP. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research, *Nutrition Reviews,* 57:7:201–214, 1999

Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010–3014, 2002

Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF- κ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.* 135: 2299–2304, 2005

Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405, 903–904, 2000

Ekhar E. Ziegler, L. J. Filer, JR. Present knowledge in nutrition · 7th edi., The Korean Nutrition Society, 1998

Fulda S. and K. M. Debatin. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028, 150–156, 2004

Gilmore TD, Morin PJ. The I κ B proteins : members of a multifunctional family. *Trends Genet.* 9:427–33, 1993

Janssen YMW, Sen CK. Nuclear factor B activity in response to oxidants and antioxidants. *Methods Enzymol.* 300, 363–374, 1999

Joe AK, Liu HR, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 8: 893–903, 2002

Johanna WL. Health effects of vegetables and fruit : assessing mechanisms of action in human experomental studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 70:475–490, 1999

Khanizadeh S, Tsao R, Rekika DJ, Yang R, Charles MT, Rupasinghe V. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J Food Compost Anal* 21: 396–401, 2008

Kuo P, Liu H, Chao J. Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279: 55875–55885, 2004

Lee KY, Chang W, Qiu D, Kao PN, Rsen GD. PG490 (Triptolide) cooperates with tumor necrosis factor- α to induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem*, 274:13451–13455, 1999

Liu Z, Hsu H, Goeddel D, Karin M. Dissection of TNF receptor1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell*, 87:565–576, 1996

Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2926–2930, 2002

Liu RH, Jacob J, Tennant B. Chemiluminescent detection of protein molecular weight markers in western blot techniques. *Biotechniques* , 22, 594–595, 1997

Liu RH, Liu J, Chen B. Apples prevent mammary tumors in rats. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2341–2343, 2005

Maurice ES, James AO and Moshe S. *Modern nutrition in health and disease* · 8th edi., Lea & Febiger, 1994

Miyamoto S, Verma IM. REL/NF- κ B /I κ B story. *Adv Ca Res.* 66:255–92, 1995

Nakajima H, Nagaso H, Kakui N, Ishikawa M, Hiranuma T, oshiko S. Critical role of the automodification of poly-(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-B-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 42774–42786, 2004

Nguyen TTT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 25: 647–659, 2004

Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J. Cell Sci.* 92, 513–518, 1989

Place RF, Noonan EJ, Giardina C. HDAC inhibition prevents NF- κ B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I κ B. *Biochem. Pharmacol.*, 70, 393–406, 2005

Pozo-Guisado E, Merino JM, Mulero-Navarro S, Lorenzo-Benayas MJ, Centeno F, Alvarez-Barrientos A, Salguero PMF. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-B. *Int. J. Cancer*, 115, 74–84, 2005

Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 124:1–6, 1994

Sarkar FH. and Y Li. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front. Biosci.* 13, 2950–2959, 2008

Schulze-Osthoff K, D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254, 439–459, 1998

Spencer, et al., Modulation of Pro-survival Akt/Protein Kinase B and ERK1/2 Signaling Cascades by Quercetin and Its in Vivo Metabolites Underlie Their Action on Neuronal Viability. *J. Biol. Chem.* 278, 34783–34793, 2003

Sun J, Liu RH. Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cells through cell cycle modulation. *J. Agr. Food Chem.* 56: 11661–11667, 2008

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74:845–853, 1993

Tavani A. and La VC. Fruit and vegetable consumption and cancer risk in

a Mediterranean population, *Am. J. Clin. Nutr.* 61:1374–1377, 1995

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Antwerp DV, Miyamoto S. Rel/NF κ B/I κ B family : intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9:2723–35, 1995

Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol. Cell. Biochem.* 287: 109–116, 2006

Walker WH, Stein B, Ganchi PA, Hoffman JA, Kaufman PA, Ballard DW, Hannink M, Greene WC. The v-rel oncogene : insights into the mechanism of transcriptional activation, repression, and transformation. *J Virol* 66:5018–29, 1992

Wang CY, Mayo MW, Baldwin Jr AS. TNF- α and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*, 274:784–787, 1996

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF- κ B apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 281:1680–1683, 1998
Wilhelmsen KC, Eggleton K, Temin HM. Nucleic acid sequences of the oncogene v-rel in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene c-rel. *J Virol* 52:172–82, 1984

Willett WC. Diet and health: What should we eat? *Science* 264: 532–537, 1994

Willett, WC. Micronutrients and cancer risk, *Am. J. Clin. Nutr.* 59:1162–1165, 1994

William A. Pryor, Wilhelm Stahl and Cheryl L. Rock : Beta Carotene : From Biochemistry to Clinical Trials, *Nutrition Reviews*, 58:2:39–53,

2000

Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* 51, 609–614, 2003

Wyllie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251–306, 1980

Yoon HG, Lee CY. Effect of Selected Phytochemicals on Cell Proliferation in A549 Lung Cancer Cells. *Food Sci. Biotechnol.* 19(4): 1063–1068 , 2010

Yoon HG, Liu RH. Effect of selected phytochemicals and apple extracts in NF- κ B activation in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Agric. Food Chem.* 55; 3167–3173, 2007

Yun HJ, Lim SY, Hur JM, Jeong JW, Yang SH, Kim DH. Changes of functional compounds in, and texture characteristics of apples, during post-irradiation storage at different temperatures. *Korean J Food Preserv* 14: 239–246, 2007

ABSTRACT

Effect of selected phytochemicals on Growth Inhibition

of Human Lung Cancer A549 Cells

CHO, Woo-Ree

Department of Food & Nutrition,

The Graduate School,

Sungshin Woman's University

Lung Cancer is the one of the major causes of mortality and 30 deaths/100,000 populations of all deaths(497.3 deaths/100,000 populations) were caused by cancer-related diseases in the Korea in 2009.

Effects of apple extracts and quercetin 3- β -D-glucoside(Q3G) on A549 human lung cancer cell proliferation and the mechanism of these phytochemicals in regulating apoptosis and cell cycle arrest were investigated. A549 cells were treated with apple extracts(0-200 mg/mL) and Q3G(0-200 μ M) at 37°C for 24 hr or 96 hr and cell viability was measured with Methylene blue solution (Methylene blue) assay and measured with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Apple extracts and Q3G inhibited A549 lung cancer cell proliferation in a dose-dependent manner.

Nuclear factor κ B (NF κ B) is a transcription factor, which plays an important role in inflammation, cell proliferation, apoptosis, and

immunity in eukaryotes. In cancer cells, NF κ B induces resistance to anticancer chemotherapeutic agents by increasing cell proliferation and inhibiting apoptosis. Therefore, inhibition of NF κ B activation in cancer cells is advantageous in cancer therapy by lowering the resistance to chemotherapy.

Apple extracts (0, 5, 10, 20, 50 mg/mL) significantly inhibited the TNF- α -induced NF κ B activation at a dose of 10–50 mg/mL ($p < 0.0001$) and Q3G (0, 5, 10, 50, 100 μ M) a slight increased the TNF- α -induced NF κ B activation. These results suggest that Apple extracts inhibit A549 lung cancer cell proliferation and regulate the expression of the proteins involved in apoptosis and cell cycle.

Phytochemicals from fruits, apple extracts and Q3G have been reported to inhibit NF κ B activation, but the mechanisms of how the phytochemicals work have not been fully understood.

Apple extracts significantly inhibited the TNF- α -induced phospho I κ B α (p-I κ B α) activation at a dose of 10–50 mg/mL ($p < 0.05$). These results suggest that apple extracts inhibit A549 lung cancer cell proliferation and regulate the expression of the proteins involved in apoptosis and cell cycle.

Apple extracts significantly inhibited proteasome activation dose dependent at a dose of 50 mg/mL to 11.3% ($p < 0.0001$) and Q3G a slight inhibited proteasome activation at a dose of 5–100 μ M to 53.3, 50.9, 48 and 50.4%. These results suggest that Apple extracts inhibit A549 lung cancer cell proliferation and regulate the expression of the proteins involved in apoptosis and cell cycle.