윤 현 근 교수지도

석사학위 청구논문

매실 유용성분의 폐암세포 생장억제 기전에 관한 연구

2013

성신여자대학교 교육대학원

교육학과 영양교육전공

김 지 은

매실 유용성분의 폐암세포 생장억제 기전에 관한 연구

윤 현 근 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2012년 11월

성신여자대학교 교육대학원

교육학과 영양교육전공

김 지 은

인 준 서

김지은의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

성신여자대학교 대학원

논문개요

본 연구는 매실 추출액과 매실 유용성분인 Ursolic acid와 Oleanolic acid에 의한 인간 폐암 세포인 A549의 생장억제 기전을 밝히고자한 연구이다.

세포내 신호전달계로 생물학적 반응에 중요한 역할을 하는 전사조절인자인 NFκB의 핵 내 유입을 알아보기 위함과 세포 독성율 및 증식율을 보기 위해 매실 추출액의 농도를 0, 5, 10, 20, 30 mg/mL 으로 희석하여 처리하였고, 매실의 유용성분인 Ursolic acid와 Oleanolic acid도 세포 독성율과 증식율, 더불어 Proteasome 활성을 측정하기위해 각 농도를 0, 5, 10, 20, 40, 80 μM 과 0, 10, 40, 80 μM 으로 처리하여 실험하였다.

1. 세포 독성(Cytotoxicity) 및 증식율(Cell Proliferation)의 변화는 MTT assay를 사용하였고 독성은 10% 미만의 독성율을 나타낸 농도를 세포에 급성독성을 미치지 않는다고 보았다. 매실 추출액의 경우 농도 20 mg/mL 에서 10% 미만의 독성율을 나타냈고 30-100 mg/mL 의 농도에서는 11.2-91.23% 까지 독성율이 증가하였다.

매실 유용성분으로 처리했을 경우 첫 번째로 Ursolic acid는 농도 0-30 μM 에서 10% 미만의 독성율을 나타냈고, 40-80 μM 에서는 10.8-16.6% 까지 독성율이 증가하였으나 농도 100 μM 에서는 1.09%로 다시 감소하는 경향을 보였다. 두 번째로 Oleanolic acid는 농도 0-10 μM 에서 10% 미만의 독성율을 보였으며, 20-100 μM 에서는 오히려 독성율이 감소하는 경향을 보여 전자보다 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

증식율은 매실 추출액의 경우 농도 0-50 mg/mL 에서 감소경향을 보이다가 농도 60 mg/mL 부터는 다시 증가하였고, Ursolic acid는 농도 0-10

μM 까지 증가하였으나 그 이후로는 감소하였다. Oleanolic acid는 농도 0-30 μM 에서는 감소하였고 그 이후에 농도 40과 60에서 약간 증가하였으나 다시 낮아지는 경향을 보였다. 이를 통하여 매실 추출액과 매실 유용성분이 사람 폐암 세포인 A549의 증식을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다.

2. NFκB의 변화 농도는 Western Blot법을 이용하여 분석하였다.

NFκB의 발현 값은 매실 추출액을 0, 5, 10, 20, 30 mg/mL 으로 희석하여 처리했고, Image J 프로그램을 이용하여 Nucleolin과 NFκB의 band를 정량하여 수치화하였다.

TNF-α를 처리하지 않는 control 에서는 NFκB가 발현되지 않았으나 TNF-α를 처리하자 매실 농축액의 농도에 따라 NFκB가 활성화되어 band로 나타났다. 매실 추출액의 농도에 따라 NFκB 발현 값이 점차 증가하다가 농도 30 mg/mL 에서는 감소하는 경향을 보였지만 통계 처리를 한 결과 집단 간의 유의성은 없는 것으로 나타났다. 이를 통해 매실 추출액의 높은 농도에서 NFκB의 활성이 감소되는 경향은 보였지만 인간 폐암 세포인 A549 cell의 핵 내 유입은 유의적으로 억제하지 못하는 것으로 확인 되었다.

3. Proteasome 활성

Proteasome 역가는 형광광도계(Digital Filter Fluorometer, Turner® Ouante chTM)를 이용하여서 측정했다.

매실 추출액의 농도는 0, 5, 10, 20, 30 mg/mL 로 처리했고 Ursolic acid는 0, 5, 10, 20, 40, 80 μM, Oleanolic acid는 세포 독성율과 증식율에서 다른 처리 물질에 비해 낮은 효과를 보인 것을 토대로 저 농도에서 0과 10 μM, 고 농도에서 40과 80 μM 을 선택하여 Proteasome 활성을 측정했다.

매실 추출액은 농도 10 mg/mL을 제외한 나머지 5, 20, 30 mg/mL 농도에

서 매실을 처리하지 않은 농도 0 과 비교해 보았을 때 Proteasome 활성 값이 많이 감소되면서 통계 처리 결과 집단 간의 유의적인 차이를 보였다.

Ursolic acid는 농도가 높아질수록 매실 추출액이 비하여 Proteasome 활성이 더 감소하는 것을 알 수 있었다. 농도 10 μM 에서 약간 높아지는 경향을 보였으나 가장 높은 농도인 80 μM 에서는 Proteasome 활성 값이 8.62% 로 크게 떨어지면서 집단 간 유의성을 나타내었다.

Oleanolic acid는 농도 0, 10, 40 μM 까지는 비슷한 활성이 나타났고, 농도 80 μM 에서만 감소되어 매실 추출액과 Ursolic acid에 비해서는 낮은 Proteasome 활성을 보이며 유의적이지 않은 것으로 확인 되었다.

이와 같은 결과를 종합해보면 인간 폐암 세포인 A549에 매실 추출액을 처리했을 때 세포 독성율 및 증식율의 감소를 확인할 수 있었고, 농도 증가에 따라 Proteasome의 활성도 감소하는 것으로 나타났다. 또한 매실 추출액이 NFκB의 발현을 부분적으로 감소시키기는 하였으나 NFκB의 핵 내 유입은 유의적으로 억제하지는 못한다는 결과를 얻을 수 있었다.

매실의 유용성분으로 처리한 경우 Ursolic acid는 세포 독성율과 증식율 감소, Proteasome 활성 감소에서 모두 유의적인 것으로 확인할 수 있었다. Oleanolic acid는 세포 독성율, 증식율 억제, Proteasome 활성에서 부분적인 감소는 나타났지만 매실 추출액과 Ursolic acid의 결과와 비교했을 때는 그 효과가 낮은 것으로 나타나 인간 폐암 세포인 A549의 증식억제에는 유의적이지 않은 것으로 확인 되었다.

세 가지 처리물질 중에서도 매실 추출액을 이용했을 때가 지속적인 증식억제를 보였는데, 이는 매실 자체가 가지고 있는 유용 성분들이 추출액에도 그대로 함유되어 있어 한 가지의 물질로 처리했을 때 보다는 더 높은 효과를 보인 것으로 예측된다. 하지만 매실 추출액에 들어있는 성분들이 모두 다 폐암세포에 영향을 미쳤는지에 대한 부분이 확실치 않으며, 여러 성분

들 중에서도 Ursolic acid 처럼 한 가지 물질로 처리했을 때도 높은 증식억제를 보였듯이 어떠한 특정 물질의 영향으로서 나타날 수도 있기 때문에 매실 추출액이라는 포괄적인 부분을 더 세분화시켜 그 안에 함유되어 있는 성분들에 대한 분석과 연구가 필요하겠다.

매실을 이용한 항암 연구들을 토대로 어떠한 성분들이 효과가 있었는지 파악하고 세분화하여 폐암 세포에 적용시킨 후 영향을 미치는지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이며, 나아가 이러한 유용성분들을 이용하여 폐암을 예방 할 수 있는 기능성 식품이나 약제로서의 개발도 이루어져야겠다.

목 차

논문개요

I. 서론 ····· 1

II. 재료 및 방법 ····· 7

1. 연구재료 ····· 7

2. 연구방법 ····· 8

1) A549 cell의 배양 ····· 8

2) 매실 추출액 제조 방법 ····· 9

3) 세포 독성율(Cytotoxicity) 측정 ····· 10

4) 세포 증식율(Cell Proliferation) 측정 ····· 11

5) Western Blot법 ····· 12

6) Proteasome 활성 측정 ····· 14

7) 통계처리 ····· 15

III. 연구 결과 및 고찰 ····· 16

1) 세포 독성율(Cytotoxicity) 및 증식율(Cell Proliferation)변화 ····· 16

2) NFκB의 핵 내 발현 변화 ····· 22
3) Proteasome 활성 ····· 25

Ⅳ. 결론 ····· 29

Ⅴ. 참고문헌

ABSTRACT

List of Tables

표 1. 2009년 주요 암 발생 현황 ····· 2

표 2. 한국의 악성 신생물(암)의 성별 사망률 추이 ····· 3

표 3. 매실 추출액 및 Ursolic acid, Oleanolic acid 처리 농도 ····· 18

List of Figures

그림 1. 매실 추출액이 세포 독성율 및 증식율에 미치는 효과 ····· 19

그림 2. Ursolic acid가 세포 독성율 및 증식율에 미치는 효과 ····· 20

그림 3. Oleanolic acid가 세포 독성율 및 증식율에 미치는 효과 ····· 21

그림 4. A549 cell에 매실 추출액과 TNF-a를 처리한 후의
NFκB의 발현 변화 ····· 23

그림 5. A549 cell에 매실 추출액과 TNF-a를 처리한 후의
NFκB의 발현 변화 그래프 ····· 24

그림 6. A549 cell에 매실 추출액을 처리한 후의 Proteasome 활성
측정 결과 ····· 26

그림 7. A549 cell에 Ursolic acid를 처리한 후의 Proteasome 활성
측정 결과 ····· 27

그림 8. A549 cell에 Oleanolic acid를 처리한 후의 Proteasome 활성
측정 결과 ····· 28

Ⅰ. 서론

우리나라에서는 의료보험에 따라 2년에 한번 씩 모든 국민을 대상으로 건강검진을 하고 있다. 검진을 통해서 폐암을 발견할 확률은 전체 폐암 환자의 10% 미만이지만 기침이나 객담 등으로 조기에 발견할 수도 있다(한상갑, 2007).

폐암은 폐에 생긴 악성 종양을 말하며 기관지 및 폐포 등 폐 조직에서 발생한 원발성 폐암과 신체 다른 부위에서 폐로 악성 종양이 전이된 전이성 폐암으로 나눌 수 있다. 암세포의 크기와 형태에 따라 비소세포폐암과 소세포폐암으로 구분되며 이 두 가지 형태에 따라 임상적인 경과나 치료가 달라지는데 비소세포폐암은 조기에 진단이 가능하며 치료를 하면 완치 가능성이 있다고 본다. 하지만 소세포폐암 같은 경우는 대부분 진단 시 절제가 어려울 정도로 진행이 되어 있는 경우가 많고 몸 전체로 전이가 빠른 편이지만 항암 및 방사선 치료에는 잘 반응한다고 한다(국가암정보센터, 2010).

보건복지부에서 발표된 자료에 의하면 2009년 우리나라의 전체 암 발생자 수는 192,561명이며 그 중 폐암 발생은 19,685명으로 전체 중 10.2%로 4위를 차지하였고 성별 폐암 발생 현황을 보았을 때는 남자는 3위, 여자는 5위로 남자가 더 높았으며, 10대 암 조발생률 에서도 남자가 높게 나타났다(보건복지부, 2011).

또한 통계청에 따르면 암으로 인한 사망률은 1999년 이래로 2011년에 처음 증가현상을 보였고 그 수치는 인구 10만 명당 142.8명으로 폐암(31.7명), 간암(21.8명), 위암(19.4명) 순으로 높았으며 이 중 폐암만이 2010년 대비 증가 현상을 보였다.

표 1. 2009년 주요 암 발생 현황 : 남녀전체

(단위 : 명, 명/10만 명)

순위	암 종	발생자수	분율(%)	조발생률	표준화발생률*
	모든 암	192,561	100.0	387.8	299.4
1	갑상선	31,977	16.6	64.4	55.7
2	위	29,727	15.4	59.9	44.8
3	대장	24,986	13.3	50.3	37.3
4	폐	19,685	10.2	39.6	28.2
5	간	15,936	8.3	32.1	23.9
6	유방	13,460	7.0	27.1	22.1
7	전립선	7,351	3.8	14.8	10.4
8	담낭 및 기타담도	4,782	2.5	9.6	6.8
9	췌장	4,427	2.3	8.9	6.4
10	비호지킨 림프종	3,873	2.0	7.8	6.3

*표준인구를 우리나라 2000년 주민등록연앙인구로 사용

※출처 : 보건복지부 중앙암등록본부

표 2. 한국의 악성 신생물(암)의 성별 사망률 추이, 2001-2011

(단위: 인구 10만 명당, %)

			악성 신생물 (암)	식도암	위암	대장암	간암	췌장암	폐암	유방암	자궁암	전립선암	뇌암	백혈병
남녀 전체	2001		122.9	3.0	23.9	9.5	21.2	5.9	24.9	2.5	2.8	1.3	2.0	3.0
	2010		144.4	2.7	20.1	15.4	22.5	8.6	31.3	3.7	2.6	2.7	2.4	3.2
	2011		142.8	3.0	19.4	15.4	21.8	8.7	31.7	4.0	2.6	2.8	2.4	3.1
	10년 대비	증감	-1.6	0.3	-0.7	0.0	-0.6	0.1	0.3	0.3	0.0	0.1	0.1	-0.1
		증감률	-1.1	10.9	-3.6	-0.2	-2.8	1.2	1.1	7.5	1.3	5.2	2.2	-4.3
남	2001		156.3	5.3	30.9	10.3	31.9	6.8	36.9	0.1	-	2.6	2.2	3.4
	2010		181.0	5.0	26.1	17.4	33.4	9.3	45.7	0.0	-	5.3	2.6	3.7
	2011		178.9	5.5	25.2	17.5	32.8	9.5	45.9	0.1	-	5.6	2.6	3.6
	10년 대비	증감	-2.1	0.4	-0.9	0.0	-0.6	0.2	0.2	0.0	-	0.3	0.1	-0.1
		증감률	-1.2	8.6	-3.3	0.2	-1.9	2.6	0.3	89.2	-	5.2	2.4	-2.4
여	2001		89.3	0.6	16.9	8.7	10.3	5.1	12.8	5.0	5.7	-	1.8	2.7
	2010		107.8	0.4	14.1	13.5	11.5	8.0	16.9	7.5	5.1	-	2.2	2.8
	2011		106.7	0.6	13.6	13.4	10.9	7.9	17.4	8.0	5.2	-	2.2	2.6
	10년 대비	증감	-1.0	0.2	-0.6	-0.1	-0.6	0.0	0.5	0.5	0.1	-	0.0	-0.2
		증감률	-1.0	41.1	-3.9	-0.7	-5.2	-0.4	3.2	7.0	1.2	-	2.1	-6.6
사망률 성비 (남/여)	2001		1.75	8.67	1.82	1.19	3.11	1.34	2.87	0.01	-	-	1.17	1.26
	2010		1.68	12.76	1.85	1.29	2.92	1.17	2.70	0.01	-	-	1.20	1.32
	2011		1.68	9.82	1.86	1.31	3.02	1.20	2.63	0.01	-	-	1.20	1.38

※출처 : 2011, 사망원인통계 통계청

이 같은 사망률을 보이는 암은 악성 신생물(암)로 불리며 뇌혈관 질환, 심장질환을 포함한 3대 사망원인으로 꼽혔다(통계청, 2012). 폐암으로 인한 사망률이 증가하면서 생존율에 대한 관심도 높아지고 있는데 2005~2009년 발생한 암 환자의 5년 상대생존율(이하 생존율)은 62.0%로 지속적으로 증가하고는 있으나 폐암은 다른 암에 비하여 5년 생존율이 19%로 췌장암(8%)을 비롯하여 낮은 생존율을 보였다(보건복지부, 2011).

높은 사망률 대비 낮은 생존율을 보이는 폐암은 현대 의학기술의 발달로 다양한 치료방법이 행해지고 있지만 여전히 사망률이 높은 이유는 폐암이 초기 발견이 어렵다는 점이다. 그 이유는 초기에는 증상이 거의 없으며 어느 정도 진행된 후에도 감기와 비슷한 증상과 기침, 객담 등만이 나타나고, 폐암이 후두나 식도 등 신체의 다른 조직으로 침범한 경우에는 그 증상 또한 다르게 나타나 진단 시 어려움이 있다(국가암정보센터, 2010).

이러한 문제점으로 나선형 단층 치료, 고주파 소작술, 화학-방사선 치료 등의 여러 치료방법들에 대해 연구가 이루어지고 있으며(송창훈, 2012, Zhang X, 2010, 이헌, 2006, Thatcher, N, 2004, 강승수, 2002), 식물 및 과일 추출 성분에 의한 폐암세포 독성효과와 세포 사멸에 대한 항암 관련 연구들도 진행되어 왔다(남혜선, 2012, Hwang J.W, et al., 2012, 조우리, 2011, Yoon HG, et al., 2010, 박상은, 2009, Lu Q. Y, et la., 2009, Luo G, et al., 2008, Khan N, et al., 2007, 권강범, et al., 2006, Laurie S. A, et la., 2005, 노숙령, 2002). 또한 이러한 유용성분들은 폐암 뿐 만 아니라 그 외의 암 세포 사멸과 증식억제 효과 및 다양한 방향으로 암과의 관계성을 찾고 있다(Chen, H. et. al., 2011, Sun, J, et al., 2006, 정종태, 2006, Miller, et al., 2004, 김대중, 2003).

식물의 유용성분을 가지고 있는 여러 과일 및 채소들이 존재하지만, 그 중에서도 본 연구에서는 항산화 작용(Socheath, et al., 2005, Jae-Ho Yoon, et al., 2005, 이정현, 2002)과 향균 작용(최무영, et al., 2004, 이현애, et

al., 2003) 및 식품 품질향상을 위한 첨가제(이동혁, 2012, 김미현, 2009, 이민지, et al., 2007)로서의 다양한 기능을 하는 매실을 이용하여 폐암세포 증식억제에 효과가 있는지 살펴보고자 한다.

매실은 장미나무과의 앵두나무속에 속하는 핵과류로 따뜻한 지역을 중심으로 생산되며 매실 품종으로는 고성, 남고 등이 국내에서 재배되고 있다. 매실은 알카리성 식품으로 무기질, 칼슘, 철분, citric acid, succinic acid 등의 유기산과 섬유소 등 다양한 영양소들이 함유되어 있고 해독작용, 향균 작용, 피로회복, 항산화작용 등의 효능을 지니며 한약재로도 많이 쓰이고 있다(임성자, et al., 2012).

이런 다양한 효과를 가진 매실은 항암연구에도 이용되고 있으며 과거부터 현재까지 지속적으로 이루어지고 있고 주된 방법으로는 매실의 추출액을 이용하여 암세포에 각기 다른 방법으로 적용시킨 후 그 효과에 대하여 보고 있다.

매실의 농도를 달리한 mice 연구에서는 백혈병성 임파 모세포(L1210, P388)와 인체 장암세포(HRT-18, HCT-48, HT-29)의 증식 억제에 효과를 나타내었고(이태훈, 1988), 매실 추출 음료가 간암, 위암, 대장암, 자궁암 세포주 증식에 미치는 영향에서는 매실 20%를 함유한 음료가 위암 세포주인 SNU-16에 대해 증식억제 효과 및 1000 ㎍/mL 농도에서는 유의적으로 세포수가 감소됨을 확인 할 수 있었다(김성미, et al., 2000). 또한 매실의 메탄올 추출물(MEPM)은 인체 암세포의 성장억제 및 세포사멸을 유발하는 것으로 나타났다(You Jeong Chung, et al., 2011).

매실의 유용성분인 우르솔산(Ursolic acid)과 올레아놀산(Oleanolic acid)도 항암연구에 쓰이고 있으며, 폐암 세포의 증식 억제에도 효과가 있다고 발표된 바 있다. 이 물질들은 Triterpenoid 화합물의 일종으로서 음식이나 약초, 여러 가지 식물의 잎과 줄기에 존재하며 이 성분들을 이용하여 연구가 진행되어 왔다(권태훈, 2009, 최철웅, 2002).

Huang(Huang C. Y, et la., 2011)과 Hsu Y. L(Hsu Y. L, et al., 2004)의 연구에 의하면 Ursolic acid가 인체 안에서의 폐암 세포들의 증식 및 이동, 침입을 저해하며 비소세포성폐암(non-small cell lung cancer)에서의 세포 소멸 유도 및 cell-cycle 조절을 억제한다고 보고 있고, Oleanolic acid도 비소세포폐암의 세포소멸과 체내에서의 B16F10 Melanoma Model의 전이 또한 감소시키는 효과를 보고 있다(Kelly Araújo Lúcio, et al., 2011).

하지만 매실과 그 유용성분들은 폐암에 관한 연구 보다는 간암, 위암, 유방암 등의 다른 암 세포의 연구에서 세포소멸 및 저해제, 항암제로서 더 많은 연구가 진행되고 있으며 그 효과를 나타내고 있다(Wei J, et al., 2012, Chakravarti B, et al., 2012, 박지혁, 2012, 김경훈, 2011, Shan J. z, et al., 2011, Huang C. y, et al., 2010, 이근호, et al., 2003). 이처럼 매실을 이용하여 암 세포를 억제한다는 가능성은 발견했지만 활성물질에 관한 기전 등 지속적인 연구를 통해(You Jeong Chung, et al., 2011) 폐암에도 적용시키며 더 활발한 연구가 이루어져야 된다고 생각한다.

이에 본 연구에서는 매실 추출액과 매실 유용성분인 Ursolic acid와 Oleanolic acid를 이용하여 사람의 폐암세포인 A549 cell에 적용시켜 세포의 독성 및 세포 증식율과 핵 내 NFκB의 발현, Proteasome 활성을 측정하여 매실 성분의 기능적인 면을 확인하고자 하였으며, 더 나아가 매실을 이용한 폐암의 예방적 차원의 식품 및 약제 개발에도 도움이 되기를 바란다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구는 사람의 폐암 세포인 A549 cell을 사용하였고 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Botechnoligy, KRIBB, Korea)에서 분양받았다.

세포 배양에 사용된 F-12K 배지와 소의 혈청(Fetal bovin serum, FBS)은 GIBCO사 제품을 구입하였다. 배지를 만들 때 사용된 항생제인 Penicillin+Streptomycin과 Trypsin-EDTA, Trypan blue, DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma 사(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 매실은 대형마트에서 구입하였고 Ursolic acid, Oleanolic acid, TNF-α와 그 외 연구에 사용된 대부분의 시약들은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

Proteasome SubstrateⅢ은 CALBIOCHEM, Anti-mouse IgG, Nucleolin은 Cell Signaling에서 구입하였고 NFκB p65(112A1021) 항체(Antibody)는 Santa Cruz Biothechnoligy(Santa Cruz, CA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 연구방법

1) A549 cell 배양

A549 세포는 T75 flask에 배양하였으며, 배지의 사용 방법은 F-12K(500mL)배지에 10%의 FBS(fetal bovin serum)와 1%의 항생제(Penicillin+Streptomycin)을 섞은 후 세포에 분주했고, 37℃의 Incubator(Thermo, Medel No. 371)에서 배양하였다.

배지는 3~4일에 한번 씩 갈았고, 일주일정도 배양한 후에 70~80% 정도 자란 세포를 Trypsin EDTA를 이용하여 떼어서 원심분리기(HZ 1610, Uiversal 32R)로 Cell down 시킨 후 T75 flask에 1:3으로 계대배양 하였다.

2) 매실 추출액 제조

매실을 추출하는 방법은 매실의 과피를 포함한 과육부분 40g 과 80% 의 에탄올 80mL 와 함께 믹서로 3분간 갈았다. 이것을 비커에 옮겨 담은 후 얼음 위에서 균질기(Homegenizer, 대일랩서비스 Tops)를 이용하여 다시 3 분간 처리했다.

액체만 얻기 위해서 부흐너 펀넬(여과기)에 여과지(No. 2 Whatman)를 넣고 여과병에 꽂은 뒤 회전 증발 농축기에 연결된 펌프를 연결하고 Aspirator(GAST Manufacturing, Model No. DOA-P704-AC)를 이용하여 압력을 가하면서 걸렀다.

얻어진 여과액은 회전 증발 농축기(EYELA, Rotary Vacuum Evaporator Model No. N-N Series, CCCA-1111)를 이용하여 40℃의 water bath에서 에탄올을 증발 시킨 후 최종 20 mL 을 얻어 2 g/mL 농도의 매실 추출액을 제조하였다. 매실 추출은 실험에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

3) 세포 독성율 측정(Cytotoxicity)

세포 독성을 측정하는 방법은 MTT assay(Yoon H, et al., 2007)를 참고하여 실시하였다.

A549 cell의 밀도가 6×10^4 cell/well 이 되도록 96-well plate에 200 μl/well 씩 넣고 37℃의 Incubator(Thermo, Medel No. 371)에서 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거 하고 PBS(Phosphate buffered saline, SIGMA)로 씻은 후 매실 추출액 및 Ursolic acid, Oleanolic acid를 100 μl/well 씩 넣고 다시 24시간 동안 배양하였다.

96-well에 배지를 제거 한 후 MTT(0.5mg/mL MTT in medium)를 100 μl/well 씩 넣어 4시간 동안 Incubator(Thermo, Medel No. 371)에서 배양하였다. 다음으로 Acid-isopropanol(0.04N HCl in isopropanol)을 100 μl/well 씩 추가하여 상온에서 20시간 동안 Waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반 시켜주었고 마지막으로 Plate reader(BIOLOG, Orecision micriplate reader E10205, USA)기를 이용하여 590nm 에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포 증식율 측정(Cell proliferation)

세포 증식율을 측정하는 방법은 MTT assay(Yoon H, et al., 2007)를 참고하여 실시하였다.

A549 cell의 밀도가 4×10^4 cell/well 이 되도록 96-well plate에 100 ㎕/well 씩 넣고 37℃의 Incubator(Thermo, Medel No. 371)에서 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거 하고 PBS(Phosphate buffered saline, SIGMA)로 씻어 준 후 매실 추출액 및 Ursolic acid, Oleanolic acid를 200 ㎕/well 씩 넣고 96시간 동안 Incubator(Thermo, Medel No. 371)에서 배양하였다.

96-well에 배지를 제거 한 후 MTT(0.5mg/mL MTT in medium)를 100 ㎕/well 씩 넣어 다시 4시간 동안 Incubator(Thermo, Medel No. 371)에서 배양한 후 Acid-isopropanol(0.04N HCl in isopropanol)을 100 ㎕/well 씩 추가하였다.

상온에서 20시간 동안 Waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반 시켜주었고 마지막으로 Plate reader(BIOLOG, Orecision micriplate reader E10205, USA)기를 이용하여 590nm 에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western Blotting

시료들의 Nuclear extract 추출과 단백질 확인을 위한 Western Blot method는 선행연구(Liu RH, et al., 1997, Sun J, et al., 2008)를 참고하여 실시하였다.

6-well plate에 배양된 cell을 PBS(Phosphate buffered saline, SIGMA)로 2번 씻어주고 얼음 위에서 scraper로 세포를 떼어낸 뒤 4℃ 원심분리기(Gyrozen, Model No. 1580MGR) 130 x g 로 5분간 돌려주어 세포를 회수했다.

상등액을 제거하고 말려준 뒤 Hypotonic buffer[10mM HEPES-KOH(pH 7.8), 10mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA, 0.2mM NaF, 0.2mM Na_3VO_4, 0.4mM PMSF, 1mM dithiotheritol(DTT)]를 400 μl 씩 넣고 15분 후에 10% Igepal을 44.4 μl 씩 추가하여 15초간 vortexer로 교반 시켰다. 이것을 micro tube에 옮긴 뒤 4℃ 원심분리기(Gyrozen, Model No. mini)에서 12,000 x g 로 3분 돌렸고 얻은 추출물은 소량씩 담아 사용 전까지 -80℃ 에서 보관하였다.

각 시료들은 단백질 양을 계산하고 Sample buffer(Sigma-Aldrich, USA)와 시료를 섞어 전 처리 하였고 SDS-PAGE(polyacrylamide) gel을 이용하여 전기영동을 한 다음 Transfer Membrane(Millipore, Billerica, MA)에 단백질을 옮겨주었다. 3차 증류수로 3번 씻어 주고 Blocking buffer(0.6g non-fat dry milk in 20mL PBS)에 넣어 1시간 waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)에서 교반시켜 주었다.

Clean pouch에 membrane을 넣고 1차 항체인 NFκB, nucleolin을 넣은 후 24시간 동안 waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)로 55~60 rpm으로 교반시켜주었다. 2차 항체인 Anti-mouse IgG, Anti-biotin antibody를 넣어 2시간 동안 waving shaker(Lab companion, Model No. CWS-250)로 교반시켜준 후 마지막으로 Activation Buffer로 membrane을 1분간 처리한 후 암실에서 Amersham Hyperfilm(GE Healthcare)에 현상하였다.

6) Proteasome 활성

Proteasome 역가 측정을 위해 각 시료들에서 cytoplasmic faction을 추출하는 방법은 선행연구(Place R. H, et al., 2005)를 참고하여 실시하였다.

6-well plate에 배양된 cell은 PBS(Phosphate buffered saline, SIGMA)로 두 번 씻어주고 얼음 위에서 scraper로 세포를 떼어낸 뒤 4℃ 원심분리기(Gyrozen, Model No. 1580MGR)에서 130 x g 로 5분간 돌려주어 세포를 회수했다.

상등액을 제거한 후 말려주고 Hypotonic buffer[10mM HEPES-KOH(pH 7.8), 10mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA, 1mM dithiotheritol(DTT), H_2O]를 200 μl 씩 넣고 15분 후에 10% Igepal을 22.2 μl 씩 추가하여 15초간 vortexer로 교반시켜 주었다. 이것을 micro tube에 옮겨주고 4℃ 원심분리기(Gyrozen, Model No. mini)에서 12,000 x g 로 3분간 돌려준 뒤 위에 뜬 cytosolic faction을 얻어내었고 사용 전까지 -80℃ 에서 보관하였다.

준비해둔 cytoplasmic faction의 단백질 양을 측정하고 총 volum이 1mL이 되도록 각 시료별로 계산한 reaction buffer(25mM HEPES, 500 ㎛ EDTAm pH 7.6)를 proteasome substrateⅢ이 10 μl 씩 들어있는 micro tube에 넣어 주었다.

Proteasome 억제제로 MG-132(Z-Leu-Leu-Leu-al, Sigma-Aldrich/) 2㎕를 한 개의 시료 tube에 넣고 미리 5분 동안 37℃ 에서 반응시켰고 모든 시료들도 37℃ 에서 1시간 동안 반응시킨 후 Fluorescence(Q(Quantech, Model No. FM 109510-33)에서 excitation 360nm 와 emission 512nm으로 MG-132를 넣은 시료와 넣지 않은 시료의 Proteasome 활성을 측정하였다.

7) 통계처리

본 연구의 결과는 적어도 3번 반복하여 평균과 표준편차를 구하여 사용하였다. 각 항목에 따른 자료 분석은 SPSS V. 18.0 프로그램을 이용하여 통계를 실시하였다. 처리물질의 농도변화에 따른 유의성을 일원배치 분산분석(ANOVA)을 실시하여 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) 세포 독성율(Cytotoxicity) 및 증식율(Cell proliferation)의 변화

세포 독성율(Cytotoxicity)은 매실 추출액과 Ursolic acid, Oleanolic acid의 농도를 달리하여 세포에 처리한 후 하루 동안에 매실 추출액 및 유용성분들이 세포에 급성 독성을 미치는지에 대해 확인하는 실험이다.

독성이 10% 미만으로 나타나는 농도가 매실 추출액과 유용성분들이 세포에 급성독성을 미치지 않는다고 보고 10% 미만의 세포 독성 농도를 최대 농도로 선택하였다.

세포 증식율(Cell proliferation)도 독성율과 마찬가지로 매실 추출액 및 유용성분들의 농도를 달리하여 세포에 처리하는데, 96시간 동안을 두고 세포의 증식율의 변화를 확인하는 실험으로, 세포 증식율의 감소를 보이는 농도를 찾아 실험하되 세포 독성이 10%를 나타내는 농도를 기준으로 하였다. 그 처리 농도와 실험결과는 그림 1과 그림 2로 나타내었다.

매실 추출액으로 처리한 결과 농도 20 mg/mL 이하의 농도에서 10% 미만의 독성율을 보였고 농도 30 mg/mL 이상부터 증가하기 시작하면서 60 mg/mL 에서는 91.2% 의 독성율을 보였다. 매실 유용성분으로 처리했을 때는 Ursolic acid가 농도 30 μM 이하에서 10% 미만의 독성율을 나타냈고, 40-80 μM 에서는 16.6% 까지 독성율이 증가하였으나 농도 100 μM 에서는 다시 감소하였다. Oleanolic acid는 농도 10 μM 이하에서 10% 미만의 독성율을 보였으며, 농도 20 μM 이상에서는 오히려 독성율이 감소하는 것으로 나타나면서 매실 추출액으로 A549 cell을 처리 했을 때가 매실 유용성분으로 처리한 것 보다 독성율이 높다고 볼 수 있다.

이 같은 결과 매실 추출액은 10% 미만의 독성율보다 조금 더 높았던

11.2% 를 나타낸 농도 30 mg/mL 를 포함한 그 이하의 농도와 Ursolic acid와 Oleanolic acid는 매실의 농도와 비슷하게 하되 조금 더 높은 농도의 효과도 관찰할 수 있도록 실험을 진행하였고 처리 농도는 표 3으로 나타내었다.

증식율은 매실 추출액의 경우 농도 0-50 mg/mL 에서는 87% 에서 4% 까지 지속적으로 감소하다가 농도 60 mg/mL 이상부터는 다시 증가하였고, Ursolic acid는 농도 10 μM 이하에선 약간 증가했지만, 농도 20-100 μM 까지는 지속적으로 감소하면서 두 물질 다 유의적인($p<0.0001$) 것으로 나타났다. Oleanolic acid는 농도 0-30 μM 까지 약간 씩의 차이를 보이며 감소했지만, 그 이후에 농도부터는 증가와 감소가 반복되는 경향을 보이며 통계 처리 결과 유의성이($p=0.08$) 낮은 것으로 나타나 세포 증식율에 미치는 영향은 Ursolic acid와 매실 추출액이 더 큰 것으로 나타났다.

이와 같은 결과로 매실 추출액과 매실의 유용성분이 사람 폐암 세포인 A549의 증식억제에 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

표 3. 매실 추출액 및 Ursolic acid, Oleanolic acid의 처리 농도

처리 물질	농도					
매실 추출액 (mg/mL)	0	5	10	20	30	
Ursolic acid (μM)	0	5	10	20	40	80
Oleanolic acid (μM)	0		10		40	80

그림 1. 매실 추출액이 세포 독성율(Cytotoxicity) 및
증 식율(Cell Proliferation)에 미치는 효과

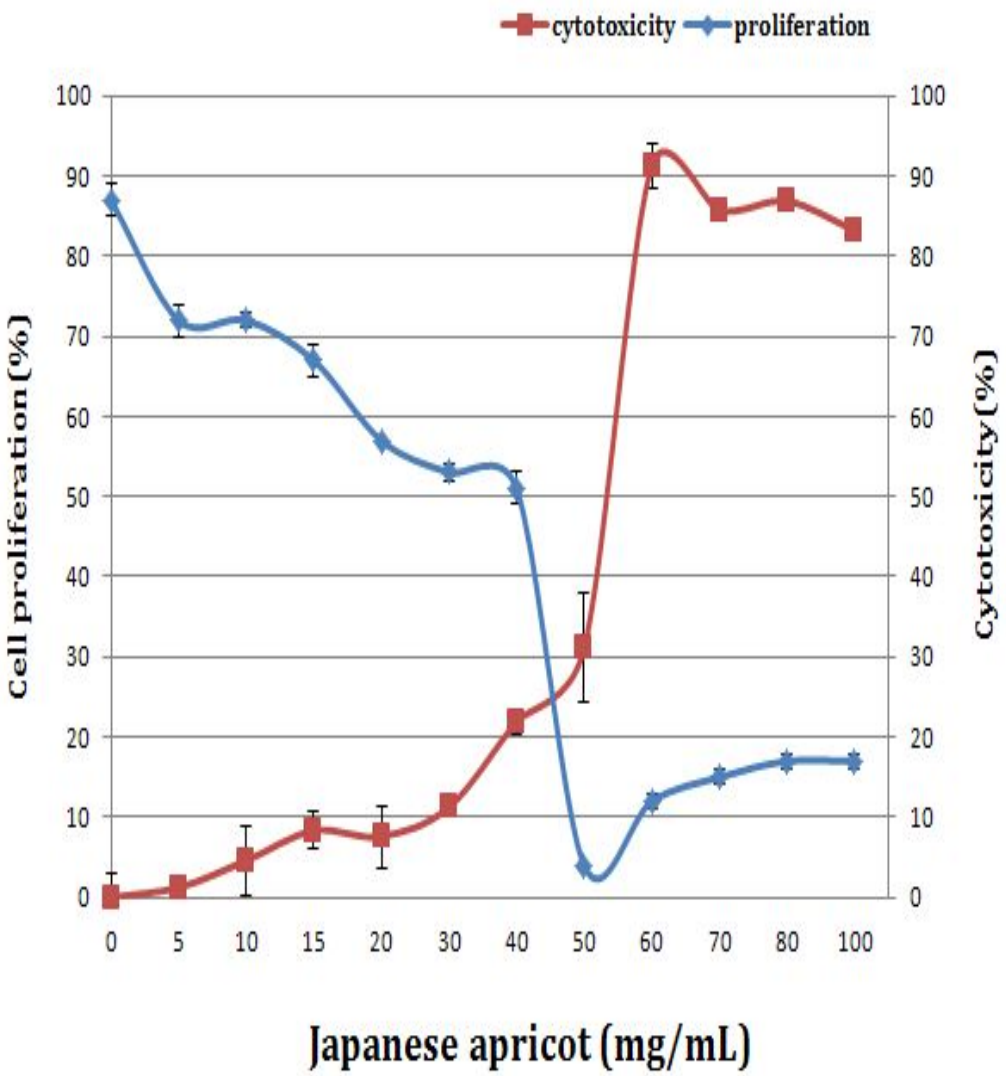


그림 2. Ursolic acid가 세포 독성율(Cytotoxicity) 및
증식율(Cell Proliferation)에 미치는 효과

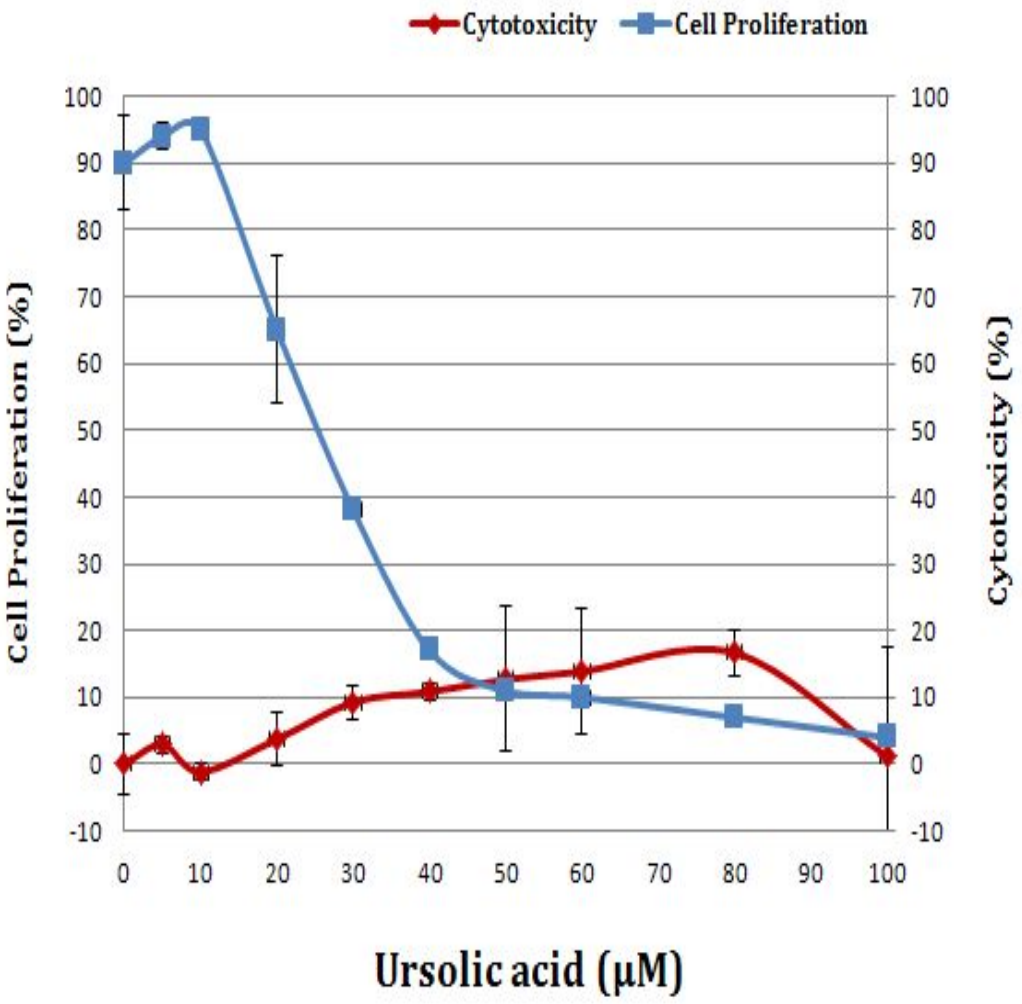
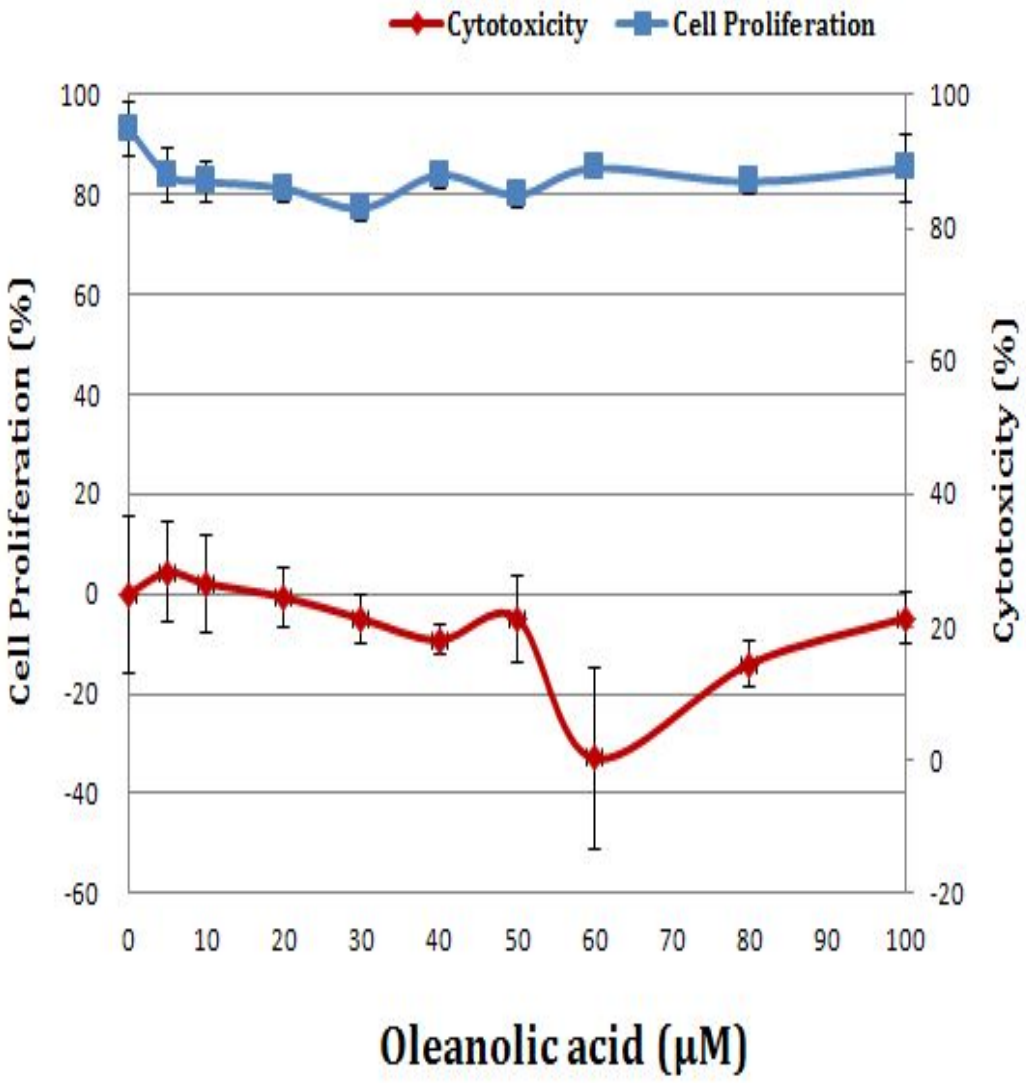


그림 3. Oleanolic acid가 세포 독성율(Cytotoxicity) 및
증식율(Cell Proliferation)에 미치는 효과



2) NFκB의 발현

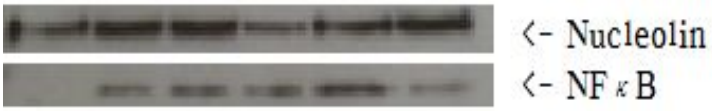
NFκB의 발현 변화는 매실 추출액을 A549 cell에 처리한 다음 TNF-a를 넣고 Western Blot 방법에 이용하여 확인하였다. 그 결과는 그림 4와 그림 5로 나타내었다.

NFκB의 핵 내 유입을 유도하고 최대한 발현시키기 위해 TNF-a를 처리하였고 Wester Blot 방법을 이용하여 특정 단백질을 band의 형태로 볼 수 있도록 나타나게 하였다. 발현 된 band는 Image J 프로그램을 이용하여 정량하였고 핵 내 측정 기준이 되는 Nucleolin의 band를 분모로, NFκB의 band를 분자로 계산하여 수치화 하였다.

TNF-a를 처리하지 않은 control에서는 NFκB band가 나타나지 않았고 그 이후의 농도부터는 발현됐다. 농도 0-10 mg/mL 까지 발현 값이 점차 증가하다가 농도 30 mg/mL 에서 가장 낮은 값을 나타냈으나, 통계 처리 한 결과 집단 간 유의적인 차이가 없는 것으로 확인 되었다.

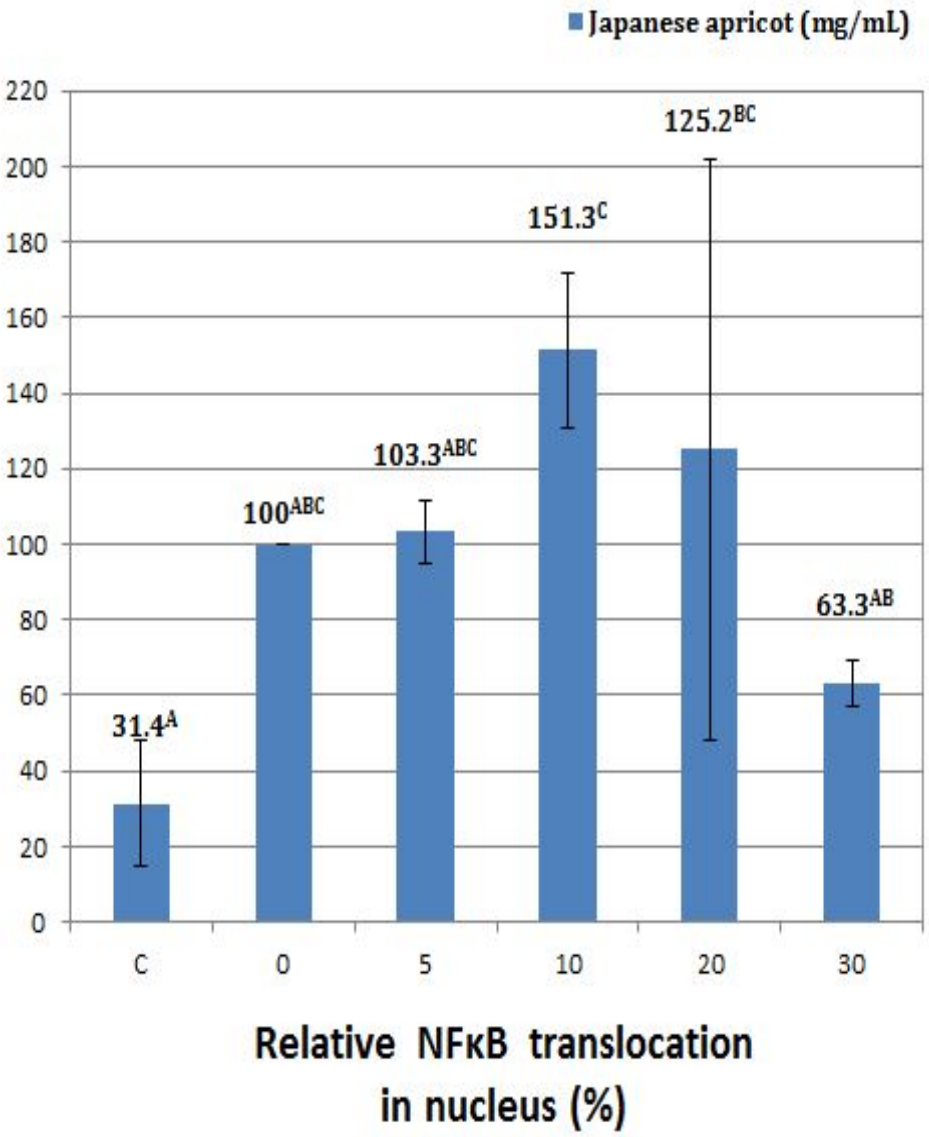
이를 통해 인간 폐암 세포인 A549 에 매실 추출액을 처리했을 때 부분적으로 NFκB의 감소 경향은 보였으나 핵 내 유입은 크게 저해하지 못하는 것으로 나타났다.

그림 4. A549 cell에 매실 추출액과 TNF-a를 처리한 후의 NFκB 발현 변화



매실 추출액(mg/mL)	control	0	5	10	20	30
TNF-a	-	+	+	+	+	+

그림 5. A549 cell에 매실 추출액과 TNF-a를 처리한 후의
NFκB 발현 변화 그래프



3) Proteasome 활성

세포질 내 Proteasome 활성은 매실 추출액과 매실 유용성분인 Ursolic acid 와 Oleanolic acid 를 이용하여 A549 cell에 농도별로 처리하였고 형광광도계를 사용하여 측정한 결과를 그림 6, 그림 7, 그림 8로 나타내었다.

매실 추출액의 농도는 0, 5, 10, 20, 30 mg/mL 으로 처리하였고, 농도 10 mg/mL 에서 활성 값이 약간 증가한 것을 제외하고는 나머지 농도 5, 20, 30 mg/mL 에서 Proteasome 활성 값이 낮아지면서, 이를 통계처리 했을 때 집단 간 유의적으로 감소됐음을 확인 할 수 있었다.

Ursolic acid의 처리 농도는 0, 5, 10, 20, 40, 80 μM 으로 농도가 증가할수록 Proteasome의 활성 값이 감소하는 경향을 보였다. 농도 10 μM 에서는 농도 5 μM 에 비하여 활성 수치가 약간 증가하였으나 20 μM 부터는 다시 감소되면서 농도 80 μM 에서는 8.62% 로 가장 낮은 Proteasome 활성을 보이며 집단 간 유의적인 것으로 나타났다.

Oleanolic acid 는 세포 독성율과 증식율에서 다른 처리 물질에 비해 낮은 효과를 보인 것을 토대로 저 농도에서 0과 10 μM, 고 농도에서 40과 80 μM 을 선택하여 처리했다. 농도 0, 10, 40 μM 에서는 비슷한 활성으로 지속되었고, 농도 80 μM 에서만 활성이 감소되는 모습을 보이며 Ursolic acid 에 비해서는 Proteasome 활성이 낮음을 확인할 수 있었다.

그림 6. A549 cell에 매실 추출액을 처리한 후의
Proteasome 활성 측정결과

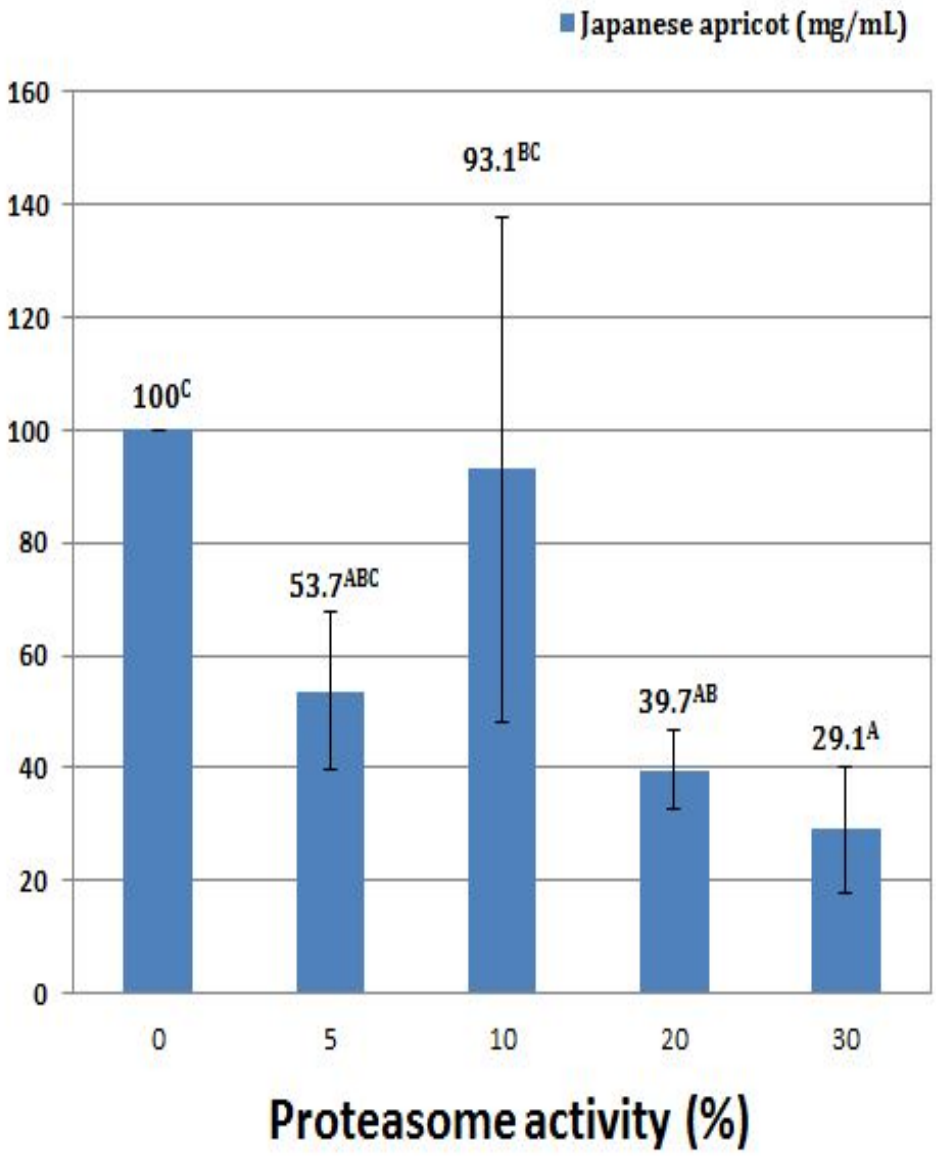


그림 7. A549 cell에 Ursolic acid를 처리한 후의
Proteasome 활성 측정결과

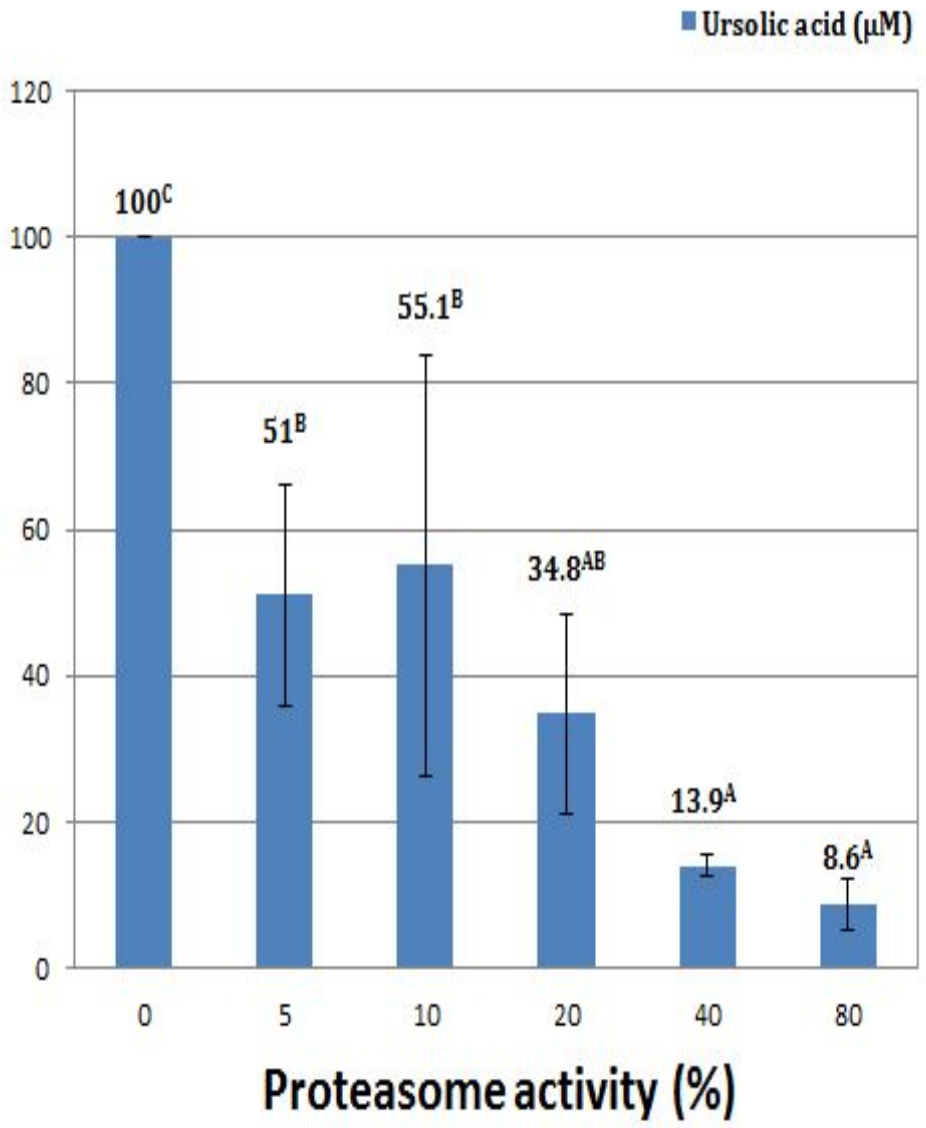
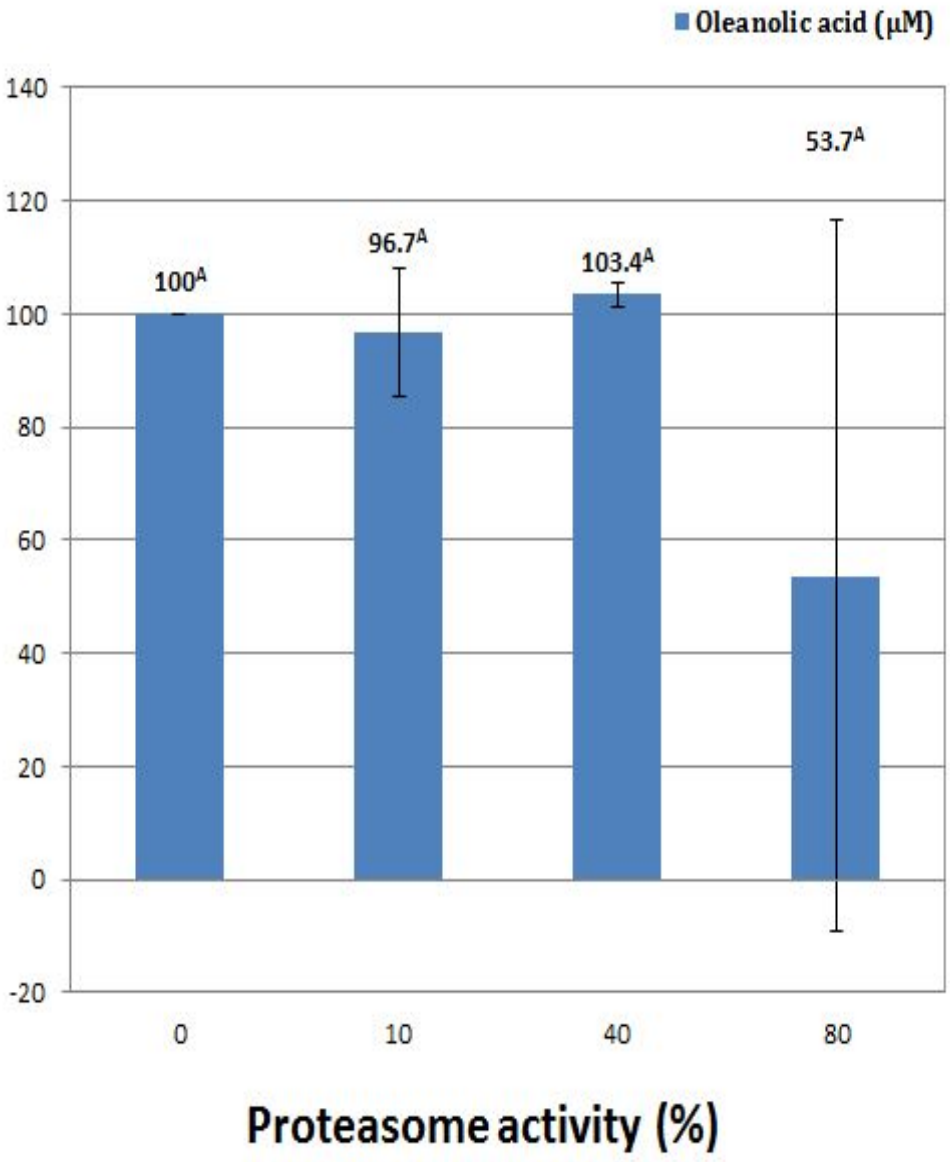


그림 8. A549 cell에 Oleanolic acid를 처리한 후의
Proteasome 활성 측정결과



Ⅳ. 결론

본 연구에서는 매실 추출액과 매실 유용성분인 Ursolic acid와 Oleanolic acid에 의한 인간 폐암 세포인 A549 cell의 생장억제 기전을 밝히고자 한 연구이다.

세포의 생장 억제 기전의 지표인 NFκB(Nuclear factor-kappa B)의 핵 내 유입을 알아보기 위하여 매실 추출액의 농도를 0, 5, 10, 20, 30 mg/mL 으로 희석하고 세포 독성율(Cytotoxicity)와 세포 증식율(Cell Proliferation)의 변화, 발현된 NFκB band의 함량 변화 및 Proteasome 활성 억제 정도를 측정하였다.

매실 유용성분인 Ursolic acid와 Oleanolic acid의 농도는 각각 0, 5, 10, 20, 40, 80 μM 과 0, 10, 40, 80 μM 으로 처리하여 매실 추출액과 마찬가지로 세포 독성율(Cytotoxicity)와 세포 증식율(Cell Proliferation)의 변화를 보았고, Proteasome 활성 억제 정도를 분석하였다.

1. 세포 독성율(Cytotoxicity) 및 세포 증식율(Cell Proliferation)

세포 독성율은 10% 미만을 독성율을 세포에 급성독성이 미치지 않는 다고 보았으며, 매실 추출액의 경우는 0-20 mg/mL 에서 10% 미만의 독성율을 나타냈고 30-100 mg/mL 의 농도에서는 11.2-91.23% 까지 독성율이 증가하였다.

Ursolic acid와 Oleanolic acid로 처리했을 경우, Ursolic acid는 0-30 μM 에서 10% 미만의 독성율을 나타냈고 40-80 μM 에서는 10.8-16.6% 까지 독성율이 증가했으나 100 μM 에서는 다시 감소하는 경향을 보였다. Oleanolic acid는 0-10 μM 에서 10% 미만의 독성율을 보였으며, 20 μM 이상의 농도부터는 오히려 독성율이 감소하는 경향을 보여 Ursolic acid 보

다는 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

세포의 증식율은 매실 추출액으로 처리했을 경우 0-50 mg/mL 에서는 감소경향을 보이다가 60 mg/mL 이상의 농도부터는 증가하였고, Ursolic acid는 0-10 μM 에서는 증가하였으나 20 μM 이상의 농도부터는 감소하면서 두 물질이 세포 증식율에서 유의성($p<0.0001$) 있는 것으로 나타났다. Oleanolic acid는 0-30 μM 에서는 감소하였고 40 μM 이상의 농도부터는 약간 증가하였지만 다시 낮아지는 경향을 보이며 유의결과가 $p=0.08$ 로 나타났다.

이를 통하여 매실 추출액과 그 유용성분이 인간 폐암 세포인 A549 cell의 증식을 억제하는 것을 확인 하였다.

2. NFκB의 발현 변화

매실 추출액을 이용한 NFκB의 발현 변화는 Western Blot 방법을 사용하여 확인할 수 있었다.

매실 추출액의 농도는 0, 5, 10, 20, 30 mg/mL 으로 처리했고 TNF-α를 이용하여 band에 나타나는 NFκB의 발현 변화를 보았다. 농도 0-20 mg/mL 까지 NFκB 의 발현 값이 점차 높아지면서 농도 30 mg/mL 에서는 발현 값이 63%로 다른 농도에 비해 감소하는 경향을 보였으나 이것을 통계처리한 결과 집단 간의 유의성은 없는 것으로 나타났다.

이를 통해 매실 추출액의 높은 농도에서 NFκB의 활성이 약간 감소되는 경향은 보였으나 인간 폐암 세포인 A549 cell의 핵 내 유입은 유의적으로 억제하지 못하는 것으로 확인 되었다.

3. Proteasome 활성 측정

Proteasome 활성은 매실 추출액과 매실 유용성분인 Ursolic acid와 Oleanolic acid를 이용하여 확인할 수 있었다.

NFκB의 핵 내 유입을 유도하는 효소인 Proteasome은 매실 추출액과 매실 유용성분들의 농도가 높아지면서 점차 감소하는 모습을 보였다.

매실 추출액으로 처리했을 때는 농도 10 mg/mL 에서 약간 증가한 것을 제외하고 나머지 농도인 5, 20, 30 mg/mL 에서는 Proteasome 활성이 점차 감소되는 것을 확인할 수 있었다. Ursolic acid 에서는 농도 0, 10 μM 에서 약간 높은 수치를 보였지만 나머지 5, 20, 40, 80 μM 농도에서는 감소되면서 농도 80 μM 에서는 8.62% 로 가장 낮은 Proteasome 활성을 보였다. 이를 통계 처리 한 결과 매실 추출액과 Ursolic acid가 집단 간 유의적인 것으로 확인되었다.

세포 독성율과 증식율에서 낮은 효과를 나타낸 Oleanolic acid는 저 농도 0, 10 μM 과 고 농도 40, 80 μM 을 선택하여 실험 하였다. 농도 0, 10, 40 μM 에서는 96-106% 로 큰 차이 없이 비슷한 활성이 지속되었고, 농도 80 μM 에서는 약간 감소하였으나 매실 추출액과 Ursolic acid에 비해서는 낮은 Proteasome 활성을 보이며 유의적이지 않은 것으로 나타났다.

이를 통하여 매실 추출액과 유용성분이 인간 폐암 세포인 A549 cell의 증식억제에 효과가 있는 것으로 확인되었고, NFκB의 활성을 차단할 수 있는 하나의 기전인 Proteasome 또한 억제하는 것으로 나타났다.

결론적으로 매실 추출액이 폐암 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났고, NFκB의 발현 감소에서는 유의적이진 않았지만 이것을 차단 할 수 있는 Proteasome 의 활성감소를 통해 NFκB의 핵 내 유입이 억제되는 것이 한 가지 경로라는 것을 확인 할 수 있었다.

매실 유용성에서는 Ursolic acid가 Oleanolic acid에 비하여 폐암 세포 증식 억제와 NFκB의 핵 내 유입을 유도하는 Proteasome 의 활성 억제에서 더 유의적으로 감소시킨다는 결과를 확인 할 수 있었다. 그러나 Kelly Araújo Lúcio(Kelly Araújo Lúcio, et al., 2011) 등의 연구에 따르면

Oleanolic acid 를 A549 와 H460 에 처리했을 때 농도에 따라 생존율이 억제되는 것으로 확인되면서 본 연구와 다른 양상을 보였는데, 이는 각 연구에서 사용한 Oleanolic acid의 처리 농도나 실험 방법 및 과정에 따른 차이로 예측된다.

세 가지 처리물질 중에서도 매실 추출액을 이용했을 때가 폐암 세포의 지속적인 증식억제를 보였는데, 이는 매실 자체가 가지고 있는 유용 성분들이 추출액에도 그대로 함유되어 있어 한 가지의 물질로 처리했을 때 보다는 더 높은 효과를 보인 것으로 예측된다. 하지만 매실 추출액에 들어있는 성분들이 모두 다 폐암세포에 영향을 미쳤는지에 대한 부분이 확실치 않으며, 여러 성분들 중에서도 Ursolic acid 처럼 한 가지 물질로 처리했을 때도 높은 증식억제를 보였듯이 어떠한 특정 물질의 영향으로서 나타날 수도 있기 때문에 매실 추출액이라는 포괄적인 부분을 더 세분화시켜 그 안에 함유되어 있는 성분들에 대한 분석과 연구가 필요하겠다.

또한 발암의 원인 중에 하나인 활성 산소를 억제 할 수 있는 항산화제의 개발과 메커니즘에 대한 연구도 지속적으로 이루어져야 한다. 활성 산소는 외부 감염으로부터 우리 몸을 보호하기도 하지만 생체 내 필요 이상으로 생성될 경우 효소와 단백질, 유전자 등을 손상시키며 암의 원인이 되고 암을 촉진시키는 단계에도 영향을 미친다고 보고 있다(정화진, et al., 2006).

이처럼 항산화의 중요성이 대두되면서 매실은 루틴(rutin)을 비롯하여 함유되어 있는 다른 성분들의 항산화성을 밝히고자 하는 연구가 여러 차례 진행되고 있다. 과일이나 차 류 등과 항산화 활성 정도를 비교해 보거나 매실의 항산화 물질을 분리시켜 화학구조를 밝히는 연구 등 다양한 방법을 통하여 항산화제로서의 매실의 기능을 확인하고 있다(이상윤, et al., 2001, 황자영, et al., 2004).

이처럼 항산화제로서의 효능을 가진 매실이 폐암 세포의 생장억제에도 효과가 있다는 것을 이번 연구를 통해 확인 할 수 있었고, 더 나아가 매실의

유용성분이라 알려진 Ursolic acid, Oleanolic acid 외에도 함유되어 있는 다른 성분들을 여러 암 연구에 적용시켜 보면서 그 특성 및 효과에 대하여 자세히 분석할 필요가 있다. 또한 발암의 원인으로 꼽히는 활성 산소를 억제할 수 있는 항산화 물질을 매실과 같은 천연 물질에서 찾고자 하는 노력도 지속적으로 이루어져야 하고, 이것들을 이용한 예방적 차원의 기능성 식품이나 치료제로서의 개발이 진행되어야 한다.

Ⅴ. 참고문헌

권강범, 김은경, 문형철, 송용선, 류도근. 폐암세포에 대한 附子 추출물의 독성효과. 한국전통의학지, Vol.15 No.1, 106-112, 2006

권태훈. Ursolic acid 및 oleanolic acid 誘導體의 合成과 生理活性 硏究 Ursolic acid 및 oleanolic acid 誘導體의 合成과 生理活性 硏究. 경희대학교 대학원, 2009

강승수. 국소 진행성 비소세포 폐암에서 화학-방사선 동시요법의 치료 효과. 고신대학교 대학원, 2002

김경훈. Ursolic acid induces apoptosis via intrinsic and extrinsic apoptotic pathway in MDA-MB-231 ER, PR negative breast cancer cells. 경희대학교 대학원, 2011

김대중. 채소와 과일 성분의 암예방 효과. 대한암예방학회지, Vol.8 No.4, 245-250, 2003

김미현. 울릉매실 분말 첨가 쿠키의 품질 특성. 상명대학교 교육대학원, 2009

김성미 ,이원재 ,배지현 ,김기진 ,이선장. 매실 추출물을 함유한 기능성 음료 개발. 한국식품과학회지, Vol.32 No.3, 713-719, 2000

남혜선. 백렴추출물이 폐암세포주 A549에 미치는 항암효과에 대한 연구. 동국대학교 대학원, 2012

노숙령, 김도희. 인체 폐암세포주 NCI-H1299에 대한 당근 추출물의 항암효과. 동아시아식생활학회지 12(4), 289-298, 2002

박상은. 인체폐암세포에서 동충하초 추출물의 세포사멸 유도 및 telomerase 활성 억제. 대전대학교 한의학과대학원, 2009

박지혁. Inhibition of Wnt/β-catenin signaling mediates ursolic acid-induced apoptosis in PC3 prostate cancer cells. 경희대학교 대학원, 2012

보건복지부 중앙암등록본부. 2009년 국가암등록통계 참고자료, 2011

보건복지부. '암환자 80만명 시대 5년 생존률 62%' 보도자료, 2011

송창훈. 국소진행성 비소세포폐암 치료에 대한 나선형단층치료와 기존의 세기조절방사선치료의 선량비교. 인하대학교 대학원, 2012

안용근. 건강기능식품. 광문각, 63p, 2004

윤원섭, 양대식, 김철용. 고령의 비소세포성폐암 환자의 방사선 및 병용치료에 대한 효과 평가. Radiation Oncology Journal, Vol.25 No.2, 101-108, 2007

이근호, 임은경, 윤주희, 엄수종, 남궁성은, 박종섭. Ursolic acid에 의한 자궁 경부암 세포주에서 항증식, 항바이러스 작용 기전 분석. Journal of Gynecologic Oncology, Vol.14 No.4, 06-314, 2003

이동혁. 매실 발효액을 첨가한 데리야끼 소스의 기호성 및 품질특성에 관한 연구. 세종대학교 대학원, 2012

이민지, 이준호. 반응표면 분석을 이용한 매실첨가 고추장의 품질특성. 한국식품영양과학회지, Vol.36 No.5, 62-628, 2007

이상윤, 백남인, 김경남, 한재택. 매실(Prunus memu) 의 항산화활성 물질,

Rutin. 한국응용생명화학회지, Vol.44 No.1, 35-37, 2001

이정현. 매실에 함유된 생리활성 물질의 항산화 작용. 朝鮮大學校 大學院, 2002

이태훈. 암세포 증식에 미치는 Prunus Mume (梅實) extract의 영향 연구. 고려대 의대 잡지, Vol.25 No.1, 1988

이헌. 수술이 불가능한 폐암 환자에서 고주파 소작술의 치료 역할 : 다른 치료 방법과 비교 연구. 전북대학교 대학원, 2006

이현애, 남은숙, 박신인, 매실(Prunus mume) 착즙액의 식중독 유발균에 대한 항균 작용. 韓國食品營養學會誌, Vol.16 No.1, 29-34, 2003

임성자, 은종방. 매실의 가공 및 유통 현황. 한국식품과학회지, 식품과학과 산업 45(2), 2-9, 2012

정유정, 박철, 정영기, 최영현. 인체 백혈병세포에서 매실 추출물에 의한 apoptosis 유도. 생명과학회지, Vol.21 No.8, 1109-1119, 2011

정종태. Isolation and characterization of a new compound from prunus mume fruit that inhibits cancer cells. Graduate School, Yonsei University, 2006

정화진, 조윤주, 원장원, 서영록. 항산화 효소의 암 예방 효과 및 발암 억제 기전. 한국환경성돌연변이발암원학회지, 26-2 : 45-47, 2006
조우리. A549 Lung Cancer Cell에서 사과농축액에 의한 NFkB 활성 억제 효과에 관한 연구. 성신여자대학교 대학원, 2011

최무영, 원향례, 박희준. 매실농축액의 항균성 검색. 한국지역사회생활과학회지, Vol.15 No.4, 2004

최철웅. 거식세포에서 oleanolic acid와 ursolic acid에 의한 metallothionein 및 iNOS 유전자의 발현조절. 조선대학교 대학원, 2000

통계청. 2011 사망원인 통계, 2012

한상갑. 기적을 만드는 21인의 암 치료법. 랜덤하우스코리아, 47-50, 2007

황자영. 매실의 건강 기능성. 식품과학과 산업, Vol.38 No.4, 112-119, 2005

황자영, 함재웅, 남성희. 매실(Prunus mume)의 항산화성. 한국식품과학회지, Vol.36 No.3, 461-464, 2004

Chakravarti, B.; Maurya, R.; Siddiqui, J. A.; Kuma. In vitro anti-breast cancer activity of ethanolic extract of Wrightia tomentosa: Role of pro-apoptotic effects of oleanolic acid and urosolic acid. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Vol.142 No.1, 72-79, 2012

Chen, H. S.; Liu, M.; Shi, L. J.; Zhao, J. L.; Zha. Effects of Raspberry Phytochemical Extract on Cell Proliferation, Apoptosis, and Serum Proteomics in a Rat Model. Journal of food science, Vol.76 No.8, 2011

Hsu, Y. L.; Kuo, P. L.; Lin, C. C. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. Life sciences, Vol.75 No.19, 2303-2316, 2004

Huang, C. Y.; Lin, C. Y.; Tsai, C. W.; Yin, M. C. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines. Toxicology in vitro, Vol.25 No.7, 1274-1280, 2011

Hwang, J.W.; Oh, J.H.; Yoo, H.-S.; Lee, Y.-W.; Cho. Mountain Ginseng Extract Exhibits Anti-Lung Cancer Activity by Inhibiting the Nuclear Translocation of NF- kappa B. The American journal of Chinese medicine, Vol.40 No.1, 187-202, 2012

Hyungeun Yoon, Rui Hal Liu, Effect of Selected Phytochemicals and Apple Extracts on NFkB Activation in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 2007

Jae-Ho Yoon, Deok-Chun Yang, Won-Seob Song. Antioxidative Activity of the Extracts of Japanese Apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc.). Plant resources, Vol.8 No.3, 2005

Kelly Araújo Lúcio,#1 Gleice da Graça Rocha,#1 Leonardo Campos Monção-Ribeiro,2 Janaina Fernandes,1 Christina Maeda Takiya,2 and Cerli Rocha Gattass1,*. Oleanolic Acid Initiates Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Reduces Metastasis of a B16F10 Melanoma Model In Vivo. PLoS One. 6(12): e28596, 2012

Khan, N.; Afaq, F.; Kweon, M.-H.; Kim, K.; Mukhtar. Oral Consumption of Pomegranate Fruit Extract Inhibits Growth and Progression of Primary Lung Tumors in Mice. Cancer Research, Vol.67 No.7, 3475-3482, 2007

Laurie, S. A.; Miller, V. A.; Grant, S. C.; Kris. Phase I study of green tea extract in patients with advanced lung cancer. Cancer chemotherapy and pharmacology, Vol.55 No.1, 33-38, 2005

Luo, G.; Guan, X.; Zhou, L. Apoptotic effect of citrus fruit extract

nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. Cancer Biology & Therapy, Vol.7 No.6, 966-973, 2008

Lu, Q. Y.; Yang, Y.; Jin, Y. S.; Zhang, Z. F.; Heb. Effects of green tea extract on lung cancer A549 cells: Proteomic identification of proteins associated with cell migration. PROTEOMICS -WEINHEIM-, Vol.9 No.3, 757-767, 2009

Miller, A. B.; Altenburg, H.-P.; Bueno-de-Mesquita. Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition. International journal of cancer, Vol.108 No.2, 2004

Shan, J. z.; Xuan, Y. y.; Ruan, S. q.; Sun, M. Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells in vitro. CHINESE JOURNAL OF INTEGRATIVE MEDICINE, Vol.17 No.8, 607-611, 2011

Socheath, Tong. Characterization of Oils from Japanese Apricot (Prunus mume) Seeds and Antimicrobial and Antioxidative Activities of the Seed Extracts. 全南大學校 大學院, 2005

Sun, J.; Hai Liu, R. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. Cancer letters, Vol.241 No.1, 2006

Thatcher, N. Place of gemcitabine in radiotherapy-chemotherapy combination regimens for stage III non-small cell lung cancer. AMERICAN JOURNAL OF CANCER, Vol.3 No.2, 2004

Wei, J.; Liu, H.; Liu, M.; Wu, N.; Zhao, J.; Xiao. Oleanolic acid potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells. ONCOLOGY REPORTS, Vol.28 No.4, 1339-1345, 2012

Yan, S. l.; Huang, C. y.; Wu, S. t.; Yin, M. c. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. Toxicology in vitro, Vol.24 No.3, 842-848, 2010

Zhang, X.; Balter, P.; Allen, P. K.; Chuang, H.; P. PET/CT and Outcome in Lung Cancer Treated with Stereotactic Body Radiation Therapy. International journal of radiation oncology, biolo, Vol.78 No.3//SUP, s16-s17, 2010

ABSTRACT

Effect of Japanese Apricot Phytochemicals on Growth Inhibition of A549 Lung Cancer Cells

Kim, Ji Eun
Major in Nutrition Education
Graduate School of Education
Sungshin Woman's University

The objective of this study is to identify the effects of Japanese apricot and its phytochemicals on inhibition of human lung cancer A549 cells.

Researches have been identified that Japanese apricot and its phytochemicals, Ursolic acid and Oleanolic acid, inhibit proliferation of human cancer cells and lead apoptosis. Researches on effectiveness of Japanese apricot on lung cancer, however, haven't been studied fully.

A549 cells were treated with diluted Japanese apricot extracts(0-100

mg/mL), diluted Ursolic acid(0−100 μM), and diluted Oleanolic acid(0−100 μM) at 37℃ for both 24 hours and 96 hours. Cell viability was measure using MTT(3−(4,5−dimethylthiazol−2−yl)−2,5−diphenyltetrazolium bromide) assay, and NFκB(nuclear factor kappa−light−chain−enhancer of activated B cells) activation was measured using Western blotting method.

As the Japanese apricot concentration(0, 5, 10, 20, 30 mg/mL) increased, the proliferating rate of A549 cells decreased; at the concentration of 50 mg/mL, the proliferating rate decreased greatly to 5%($p<0.0001$). Also the Japanese apricot extracts reduced NFκB activation at the concentration of 30 mg/mL to 63.3% and decreased Proteasome activation at the concentrations of 5, 20, 30 mg/mL.

Ursolic acid(0, 5, 10, 20, 40, 80 μM) turned out to perform better than Japanese apricot extracts. It sharply dropped the proliferating rate of A549 cells at the concentrations between 10−40 μM($p<0.0001$). Also, Ursolic acid generally inhibited Proteasome activation; especially Proteasome activation was greatly decreased to 8.62% at the concentration of 80 μM.

Oleanolic acid(0, 10, 40, 80 μM) showed relatively lower effects on inhibition of cell proliferation compared to Japanese apricot extracts and Ursolic acid ($p=0.08$). Also, Oleanolic acid reduced Proteasome activation only at a high concentration of 80 μM.

Therefore, the results of this study indicate that Japanese apricot extracts and its phytochemicals have effects on inhibiting the proliferation of lung cancer cells; thus it can be said that they might be used as medication for treating or preventing lung cancer.