



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

윤 현 근 교수지도
석사학위 청구논문

세포 기반 proteasome 역가 측정법
개발 및 차류의 항암 효과 연구

2016

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

김 소 영

세포 기반 proteasome 역가 측정법
개발 및 차류의 항암 효과 연구

윤 현 근 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2015년 11월

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

김 소 영

인 준 서

김소영의 석사학위 논문으로 인준함

2015년 11월

심사위원장 _____인

심 사 위 원 _____인

심 사 위 원 _____인

성신여자대학교 대학원

논문개요

Proteasome은 세포내에 존재하는 단백질 분해 효소이며, 세포주기, 신호 전달, 유전자 발현, 세포자가사멸과 관련된 단백질을 분해함으로써 세포 과정을 조절한다. 세포 증식을 조절하는 전사인자인 NF- κ B는 유비퀴틴화 된 I κ B- α 가 proteasome에 의해 분해됨으로써 활성화된다. 따라서 proteasome 역가 저해는 암 예방에 기여할 수 있다. 본 연구에서는 생명체의 대사 조건과 유사한 환경을 제공할 수 있는 세포 기반 proteasome 역가 측정법 (CPA assay)을 개발하였고, proteasome 역가 저해를 통한 차류 (감잎, 녹차잎, 솔잎)의 항암 효과를 확인하기 위해 차류가 proteasome 역가 저해, 간암 세포의 세포 증식과 세포 주기 및 NF- κ B 발현에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. CPA assay를 이용하여 측정한 감잎, 녹차잎, 솔잎의 proteasome 역가 저해율은 농도가 증가할수록 농도-의존적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 또한, 감잎, 녹차잎, 솔잎은 100 μ g/mL의 농도에서 간암 세포의 세포 증식을 유의하게 억제하였으며 ($p < 0.05$), 각각 75.9 ± 5.1 %, 33.4 ± 1.4 %, 60.5 ± 8.6 %의 세포 증식률을 나타냈다. 세포 주기 분석에서 감잎, 녹차잎, 솔잎 모두 세포 주기를 저해하는 것으로 나타났고, 각각 G2/M, S, S기를 유의하게 저해하였다 ($p < 0.05$). NF- κ B의 발현량은 녹차잎 (1, 10, 100 μ g/mL)과 감잎 (100 μ g/mL)을 처리했을 때 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 따라서 감잎, 녹차잎, 솔잎은 proteasome 역가 저해 효과를 나타내기 때문에 천연 proteasome 저해제로서 활용이 가능할 것이다. 또한 감잎, 녹차잎, 솔잎의 간암 세포 증식 억제 및 세포 주기 저해 효과와 감잎과 녹차잎의 NF- κ B

발현 억제 효과를 통해 감잎, 녹차잎, 솔잎의 항암 효과 및 항암 기능성 식품으로서의 가능성을 확인하였다.

목 차

논문개요

- Chapter 1. Cellular Proteasome Activity (CPA) Assay 개발

I. 서론	2
II. 실험 재료 및 방법	6
1. 실험 재료	6
1.1. 시약 및 기기	6
2. 실험 방법	7
2.1. Hep G2 세포 배양	7
2.2. Cellular Proteasome Activity (CPA) assay 조건 설정	8
2.2.1. 세포 농도 설정	8
2.2.2. 기질 농도 설정	8
2.2.3. MG-132 농도 및 반응시간 설정	9
2.3. 기존의 proteasome 역가 측정법과 CPA assay의 비교	9

2.4. 통계처리	12
III. 실험 결과 및 고찰	13
1. CPA assay 방법 수립	13
2. 기존의 proteasome 역가 측정법과 CPA assay를 이용하여 측정한 flavonoid proteasome 역가 저해율 비교 및 triterpenoid의 proteasome 역가 저해율 확인	18
IV. 결론	22
- Chapter 2. Proteasome 역가 저해를 이용한 차류의 항암 효과	
I. 서론	24
II. 실험 재료 및 방법	28
1. 실험 재료	28
1.1. 시료	28
1.2. 시약 및 기기	28
2. 실험 방법	30

2.1. 차 추출 및 분말 획득	30
2.2. Hep G2 세포 배양	31
2.3. CPA assay 적용	31
2.4. 세포 독성 (Cytotoxicity)	32
2.5. 세포 증식 (Cell proliferation)	33
2.6. 세포 주기 분석 (Cell cycle analysis)	34
2.7. Western blot	35
2.8. 통계처리	37
III. 실험 결과 및 고찰	38
1. CPA assay 적용	38
1.1. 차류의 proteasome 역가 저해율 스크리닝	38
1.2. 감잎, 녹차잎, 솔잎의 농도별 proteasome 역가 저해율	40
2. 세포 독성 (Cytotoxicity)	42
3. 세포 증식 (Cell proliferation)	42
4. 세포 주기 (Cell cycle)	45
5. NF- κ B 발현 변화 (NF- κ B activation)	51

IV. 결론 55

참고문헌

ABSTRACT

List of Figures

Fig. 1. Proposed mechanism of cellular proteasome activity (CPA) assay.	10
Fig. 2. Method of cellular proteasome activity (CPA) assay.	11
Fig. 3. Determination of cell concentration.	15
Fig. 4. Determination of proteasome substrate III concentration.	16
Fig. 5. Determination of MG-132 concentration and reaction time.	17
Fig. 6. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids.	20
Fig. 7. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids.	21
Fig. 8. Cell cycle.	27
Fig. 9. Proteasome inhibition activities screening of selected tea leaves extracts.	39
Fig. 10. Proteasome inhibition activities of PSE (A), GTE (B), PNE (C).	41
Fig. 11. Effects of persimmon leaves, green tea leaves, and pine needles extracts on cytotoxicity (A) and cell proliferation (B) in Hep G2 cells.	44
Fig. 12. Flow cytometric DNA content analysis of Hep G2 cells treated with PSE.	48

Fig. 13. Flow cytometric DNA content analysis of Hep G2 cells treated with GTE.	49
Fig. 14. Flow cytometric DNA content analysis of Hep G2 cells treated with PNE.	50
Fig. 15. Effect of PSE on TNF- α -induced NF- κ B activation.	52
Fig. 16. Effect of GTE on TNF- α -induced NF- κ B activation.	53
Fig. 17. Effect of PNE on TNF- α -induced NF- κ B activation.	54

Chapter 1

Cellular Proteasome Activity (CPA) Assay 개발

I. 서 론

26S proteasome은 세포질과 핵에 존재하는 단백질 분해 효소로서, 분자량이 2.0-2.5 MDa에 달하는 원통형 모양의 거대 단백질 복합체다 [1-5]. 26S proteasome은 20S core particle (CP)과 19S regulatory particle (RP)로 구성되어 있다. 20S CP는 α -subunits로 이루어진 α -ring 2 개와 β -subunits로 이루어진 β -ring 2 개로 구성 된 4 개의 링이 쌓여있는 관 구조의 단백질 복합체이며, 약 700 KDa의 분자량을 갖는다 [5, 6]. 20S CP의 바깥쪽에 위치하는 α -ring은 α -subunit 7 개($\alpha 1-\alpha 7$)로 구성되어 있으며, 촉매 활성을 갖지 않는다. 반면, 20S CP 안쪽에 위치하는 β -ring은 α -ring 사이에 샌드위치 모양으로 존재하고, β -subunit 7 개($\beta 1-\beta 7$)로 구성되어 있으며, β -subunit 중 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ subunit은 단백질 분해 활성을 갖는다. $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ subunit은 각각 다른 분해 활성을 가지는데, $\beta 1$ subunit은 산 잔기를 우선적으로 분해하는 caspase-like activity를 갖는다. $\beta 2$ subunit은 염기성 아미노산 잔기를 우선적으로 분해하는 trypsin-like activity를 가지며, $\beta 5$ subunit은 C-말단에 친유성 잔기를 우선적으로 분해하는 chymotrypsin-like activity를 갖는다 [5, 7]. 19S RP는 17 개의 subunit으로 구성 된 2 개의 sub-complex인 lid와 base로 이루어져 있다 [8]. Lid는 8 개의 subunit으로 이루어져 있고, ubiquitin이 붙어있는 단백질을 인식하여 poly-ubiquitin chain을 자르는 역할을 한다 [5, 9]. Base는 9 개의 subunit으로 이루어져 있고, subunit 중 6 개는 ATPase를 포함하고 있다. 또한 base는 접힌 구조의 단백질을 풀린 구조로 만들어 주고, α -ring의 개폐를

조절하여 단백질 분해 활성 부위인 20S CP로 풀린 구조의 단백질이 들어갈 수 있도록 하는 역할을 하며, 이러한 과정은 에너지를 필요로 한다 [5, 8, 9].

26S proteasome이 단백질을 분해하는 과정은 ubiquitin-proteasome system (UPS)으로 설명할 수 있다. UPS는 잘못 접히거나 손상된 단백질뿐만 아니라 조절단백질을 분해함으로써 세포 과정을 조절하는 기능을 하며, 연속적인 2 단계 과정으로 단백질을 분해한다 [10, 11]. 첫 번째 단계는 ubiquitin이 3 가지 효소-E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), E3 (ubiquitin-protein ligase)-에 의해 활성화 된 후, 기질에 결합하여 poly-ubiquitin chain을 형성한다 [11, 12]. 두 번째 단계는 ubiquitin이 결합 된 단백질이 26S proteasome에 의해 펩타이드로 분해되고, ubiquitin은 단백질에서 떨어져 나와 다시 같은 기능을 수행한다 [11, 13]. 따라서 UPS의 proteasome이 대사과정, 세포주기, 신호 전달, 유전자 발현, 세포자가사멸과 관련된 단백질을 분해함으로써 기본적인 세포 과정을 조절하기 때문에 진핵생물에서 필수적인 기능을 하지만, proteasome에 장애가 생기면 암, 자가면역질환, 신경퇴행성질환, 바이러스 감염과 같은 다양한 질병을 야기하므로 proteasome은 많은 질병들의 잠재적 치료 표적으로 여겨지고 있다 [14-16]. 특히, 암세포의 proteasome 활성 억제는 세포 사멸 과정으로 들어가도록 하는 반면, 정상세포는 proteasome의 활성이 억제되더라도 세포 분열 능력을 회복하기 때문에 정상 세포보다 암세포의 proteasome 활성 억제는 더 치명적이다 [17]. 또한 proteasome의 활성 억제는 복합적인 메커니즘을 통해 종양 세포 증식, 종양 확산, 혈관 생성을 억제하기 때문에 항암제로 사용할 수 있는 다양한 proteasome 저해제가 개발되었다 [18].

proteasome 저해제로는 대표적으로 bortezomib, MG-132, carfilzomib, marizomib, lactacystin이 있다 [16, 19]. bortezomib은 최초의 proteasome 저해제로 개발되었고 FDA 승인을 받았으며, $\beta 5$ subunit (chymotrypsin-like)의

활성을 가역적으로 저해함으로써 proteasome 저해 효과를 갖는다. 또한 다발성 골수종 (multiple myeloma), 외투세포림프종 (mantle cell lymphoma)에 대한 치료 효과가 보고되었다 [20]. MG-132는 실험실에서 합성하여 개발한 proteasome 저해제이며, 세포투과성이 있어서 세포내로 쉽게 들어가 $\beta 5$ subunit (chymotrypsin-like)의 활성을 가역적으로 저해함으로써 proteasome의 작용을 억제한다 [21, 22]. Carfilzomib은 $\beta 5$ subunit (chymotrypsin-like)을 비가역적으로 저해하는 저해제이며, 비가역적이기 때문에 가역적 저해제인 bortezomib보다 더 강력한 proteasome 저해 활성을 갖는다 [23]. Marizomib은 $\beta 1$ (caspase-like), $\beta 2$ (trypsin-like), $\beta 5$ (chymotrypsin-like)의 활성을 모두 저해하는 비가역적 proteasome 저해제이며, 종양세포 증식 저해와 세포자가사멸을 유발한다고 보고되었다 [24, 25]. Lactacystin은 *Streptomyces lactacysinaeus*의 대사물질에서 발견된 천연 proteasome 저해제이며, $\beta 1$ (caspase-like), $\beta 2$ (trypsin-like), $\beta 5$ (chymotrypsin-like)의 활성을 모두 저해하지만 특히 $\beta 5$ 의 활성을 우세하게 저해함으로써 proteasome 저해 효과를 갖는다 [26, 27]. 한편, 알려진 proteasome 저해제 이외에도 (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG), resveratrol, apigenin, genistein, curcumin, quercetin 등의 flavonoids와 celastrol, withaferin A, pristimerin 등의 triterpenoids 즉, phytochemical이 proteasome 저해 효과가 있다고 보고되었으며, proteasome 저해를 통해 암세포 증식을 억제하는 항암효과 또한 증명되었다 [16, 19, 28].

현재 사용되는 proteasome 역가 측정법은 세포 추출액을 이용하는 것이다. 즉, 세포에 lysis buffer를 첨가하여 세포 추출액을 얻고, 세포 추출액에 포함되어 있는 proteasome에 시험 시료 및 proteasome 저해제를 넣어 반응시킨 후, proteasome substrate III를 첨가하고 반응시켜 형광계를 이용하여 proteasome 역가를 측정한다 [29]. 이러한 *in vitro* proteasome 역가 측정 법은 널리 쓰이지만,

생리학적인 pH와 온도에서 수행되지 않고, proteasome 저해제의 생체이용률, 흡수 및 대사를 고려하지 않는다는 단점이 있다 [30]. 반면, 세포 실험 모델은 상대적으로 비용과 시간이 적게 들고, proteasome 저해제의 흡수 및 대사를 고려함으로써 생명체의 대사 조건과 유사한 환경을 제공할 수 있다 [31]. 따라서 식품 성분 및 phytochemical이 세포내에 작용함으로써 나타나는 생리활성을 스크리닝할 수 있는 세포 기반 proteasome 역가 측정법 개발은 세포 추출액을 이용한 proteasome역가 측정법의 한계점을 개선함으로써 앞으로 식품 성분에 존재하는 proteasome 저해제를 확인하는데 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 세포 기반 proteasome 역가 측정법 (cellular proteasome activity assay; CPA assay)을 개발하기 위해 분석법 조건 확립 및 CPA assay와 기존의 proteasome 역가 측정법을 비교해보고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1.1. 시약 및 기기

세포 배양에 사용된 2.00 mM L-Glutamine과 Earle's balanced salts가 포함되어 있는 MEM배지는 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)과 phenol red가 포함되지 않은 MEM 배지는 Gibco (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 배지에 첨가한 penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA solution, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. CPA assay에 사용된 MG-132와 proteasome substrate III (fluorogenic)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, 실험에 사용된 flavonoid와 triterpenoid인 baicalein, baicalin, kaempferol, myricetin, hispidulin, (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG), betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid 및 실험에 사용된 대부분의 시약은 Sigma-aldrich에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 CO₂ incubator (371, Thermo, USA), multimode microplate reader (SpectraMax M5/M5^e, Molecular devices, USA) 이다.

2. 실험 방법

2.1. Hep G2 세포 배양

인간 유래 간암 세포주인 Hep G2 cell (human hepatocarcinoma cell line)은 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 배양 조건은 MEM 배지에 10 % FBS와 1 % penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 세포 배양에 사용하였고, 세포는 T 25 혹은 T 75 flask에 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 배지는 3 - 4일에 한 번씩 교환하였고, flask에 세포가 70 - 80 % 자라면 trypsin-EDTA solution을 처리하여 세포를 떼어준 후, 1:3으로 계대 배양하였다.

2.2. CPA assay 조건 설정

2.2.1. 세포 농도 설정

세포 농도 설정 실험은 96-well plate에 들어갈 수 있는 포화 세포 농도를 찾기 위해 수행하였다. 세포 농도는 Hep G2 cell을 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 8×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 cell/well의 농도로 $100 \mu\text{L}$ 씩 96-well plate에 분주한 후 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, PBS로 1회 세척한 뒤, FBS와 phenol red가 포함되지 않은 MEM (no phenol red free MEM) 배지에 proteasome substrate III를 $100 \mu\text{M}$ 의 농도로 희석하여 처리한 즉시 380 nm excitation, 460 nm emission에서 microplate reader로 형광을 60분간 2분 간격으로 측정하였다.

2.2.2. 기질 농도 설정

기질 농도 설정 실험은 세포내의 proteasome이 proteasome substrate III와 충분히 반응할 수 있는 적절한 농도를 찾기 위해서 수행하였다. 세포 농도 설정 실험 후 결정 된 세포 농도인 8×10^4 cell/well의 농도로 96-well plate에 $100 \mu\text{L}$ 씩 Hep G2 cell을 분주하고 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척한 후, proteasome substrate III를 0, 50, 100, 150, 200, $400 \mu\text{M}$ 의 농도로 no phenol red free MEM 배지에 희석하여 제조한 후 96-well plate에 기질을 넣은 즉시 380 nm excitation, 460 nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하였다.

2.2.3. MG-132 농도 및 반응시간 설정

MG-132는 알려진 proteasome 저해제로서, CPA assay에서 proteasome 역가 저해율을 구하기 위해 positive control로 사용할 것이다. 따라서 MG-132 농도 및 반응시간 설정 실험은 proteasome 역가를 최대로 저해할 수 있는 조건을 찾기 위해 수행하였다. Hep G2 cell을 96-well plate에 8×10^4 cell/well의 농도로 $100 \mu\text{L}$ 씩 Hep G2 cell을 분주하고 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 FBS를 첨가하지 않은 MEM배지 (free MEM)에 0, 1, 5, $10 \mu\text{M}$ 로 희석시킨 MG-132를 각각 30분, 1시간, 2시간 동안 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 배양하였다. 반응시간이 지난 후, MG-132가 들어있는 배지를 제거하고, 다시 PBS로 1회 세척한 후 no phenol red free MEM 배지에 $100 \mu\text{M}$ 로 희석시킨 proteasome substrate III를 96-well plate에 넣은 즉시 380 nm excitation, 460 nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하였다.

2.3. 기존의 proteasome 역가 측정법과 CPA assay의 비교

앞서 CPA assay 조건 설정 실험을 통해 확립한 CPA assay 원리 및 방법은 Fig. 1, 2와 같다. 기존의 proteasome 역가 측정법과 CPA assay의 비교는 기존의 proteasome 역가 측정법을 이용하여 flavonoid의 proteasome 저해 활성을 측정한 Zheng et al. [32]의 실험 결과 중 baicalein, baicalin, hispidulin, kaempferol, myricetin, EGCG의 proteasome 역가 저해율과 CPA assay를 이용해 flavonoid를 $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ 로 반응시켜 측정한 proteasome 역가 저해율을 비교하였다.

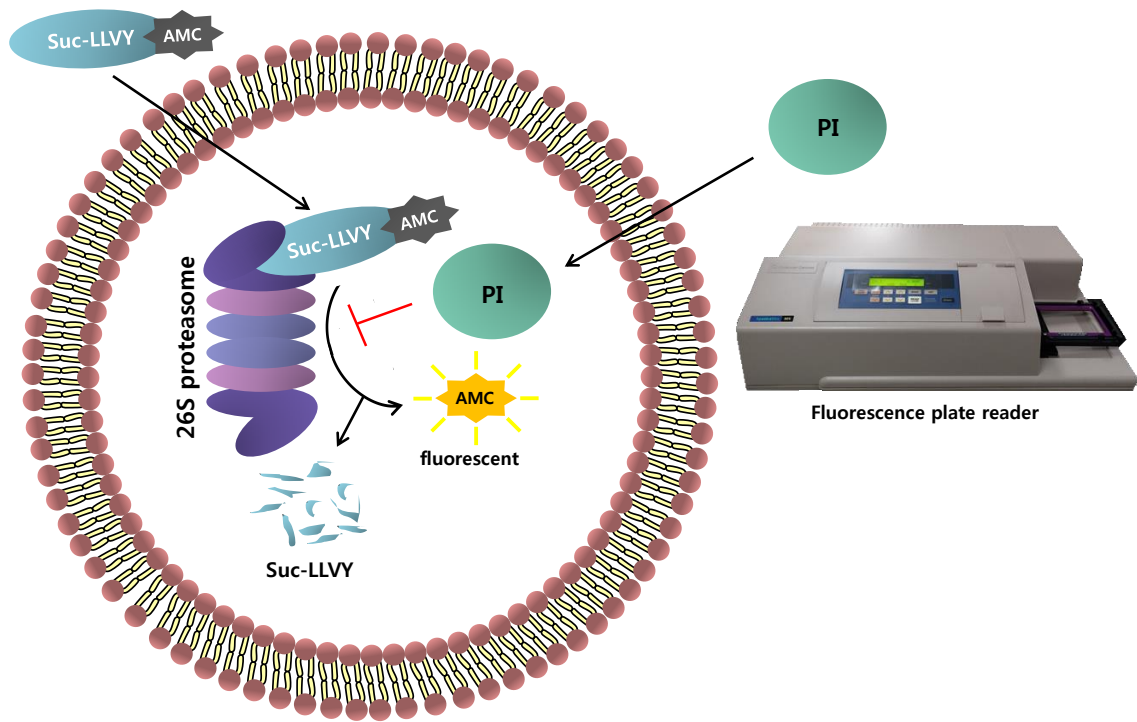


Fig. 1. Proposed mechanism of cellular proteasome activity (CPA) assay.
 PI; proteasome inhibitor, Suc-LLVY-AMC; proteasome substrate III

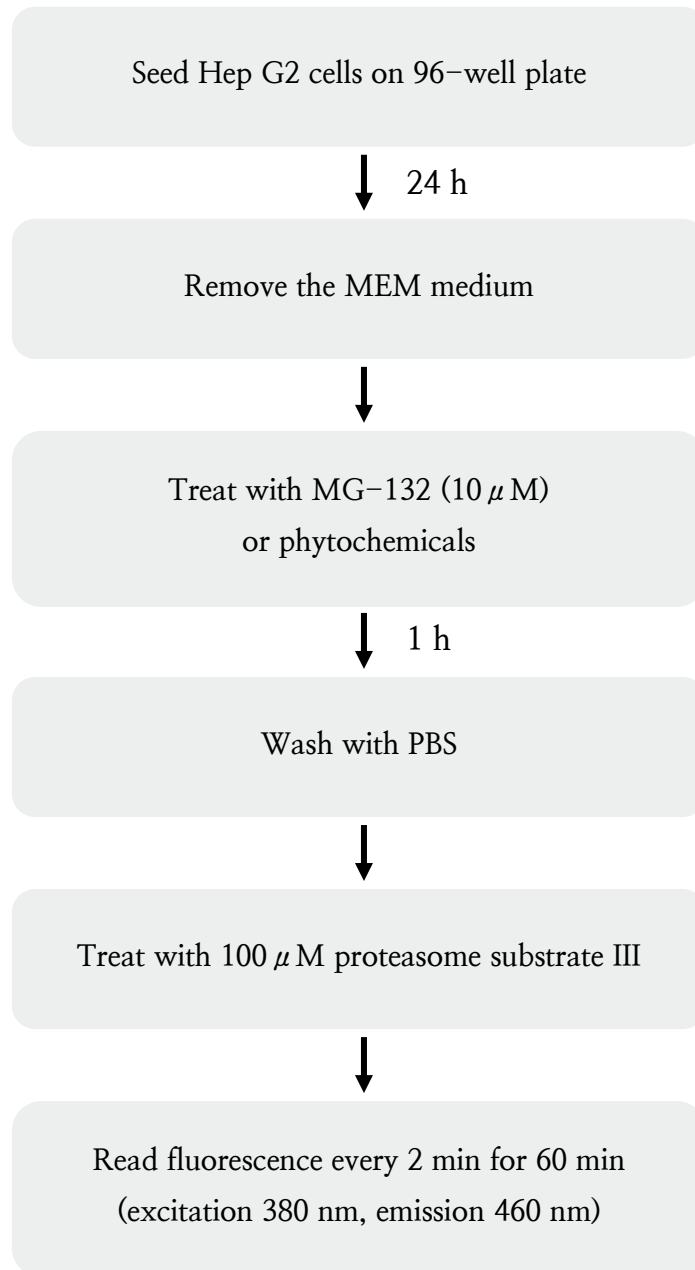


Fig. 2. Method of cellular proteasome activity (CPA) assay.

2.4. 통계 처리

본 실험의 결과는 적어도 3번 반복하여 평균±표준편차로 나타내었고, 실험 결과는 SPSS software version 22 (IBM, Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 실시함으로써 실험군과 대조군 간의 차이에 대한 통계적 유의성을 확인하였고, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 수행하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. CPA assay 방법 수립

CPA assay 방법 수립을 위해 CPA assay에 적합한 세포 농도, 기질 농도, proteasome 저해제인 MG-132의 반응 시간과 농도를 결정하는 실험을 수행하였다. Fig. 3에서 y값인 area under curve value는 세포내의 proteasome이 기질과 반응하여 나타나는 형광을 1시간 동안 2분 간격으로 측정된 결과의 적분(면적)값을 의미하며, Hep G2 cell을 농도별로 분주하였을 때 면적 값이 완만해지는 농도가 96-well plate에 포화되는 세포수로 간주하였다. 따라서 8×10^4 cell/well의 농도에서 면적 값이 완만해지는 최소 농도였기에 CPA assay의 세포 농도를 8×10^4 cell/well로 설정하였다.

Fig. 4는 proteasome과 반응했을 때 형광을 나타내는 물질인 proteasome substrate III (기질)의 농도를 결정한 결과이며, 세포 농도 결정과 마찬가지로 proteasome substrate III를 농도별로 처리하였을 때 proteasome과 반응하여 나타나는 형광의 면적이 완만해지는 시기를 substrate III의 포화 농도로 보았다. 따라서 substrate III의 농도가 $100 \mu\text{M}$ 일 때를 기점으로 그래프가 완만해지기 시작하므로 CPA assay의 substrate III 농도를 $100 \mu\text{M}$ 로 설정하였다.

Fig. 5는 CPA assay에서 control (Con)로 사용할 proteasome 저해제인 MG-132의 농도 및 반응시간을 결정한 실험 결과이다. MG-132를 0, 1, 5, $10 \mu\text{M}$ 의

농도로 각각 30분, 1시간, 2시간 처리하였고, MG-132를 10 μ M로 1시간 반응시켰을 때 proteasome 역가가 가장 낮게 나타났다. 따라서 CPA assay의 Con으로 사용할 MG-132의 농도와 반응시간은 10 μ M, 1시간으로 설정하였다.

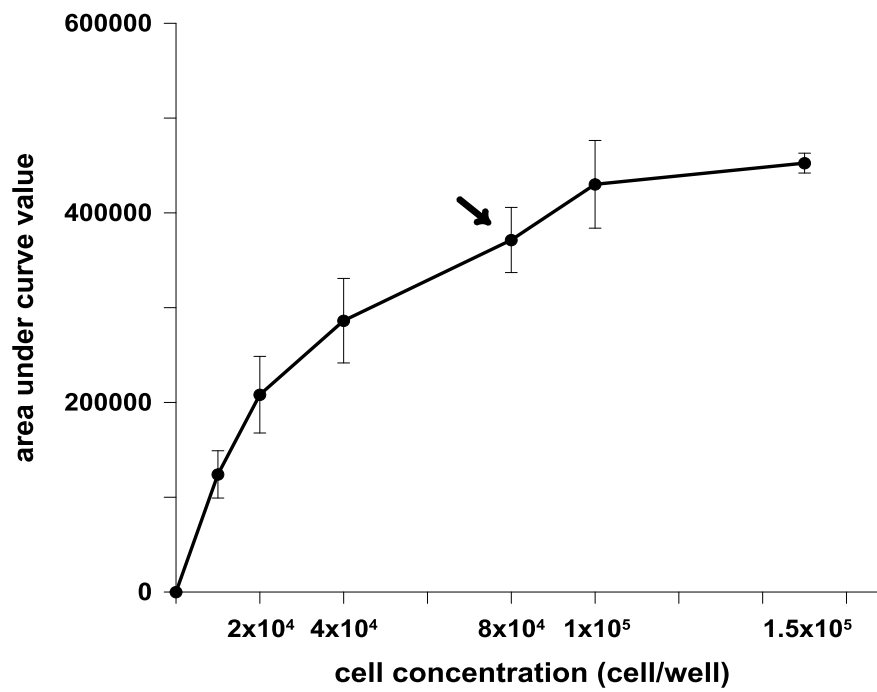


Fig. 3. Determination of cell concentration.

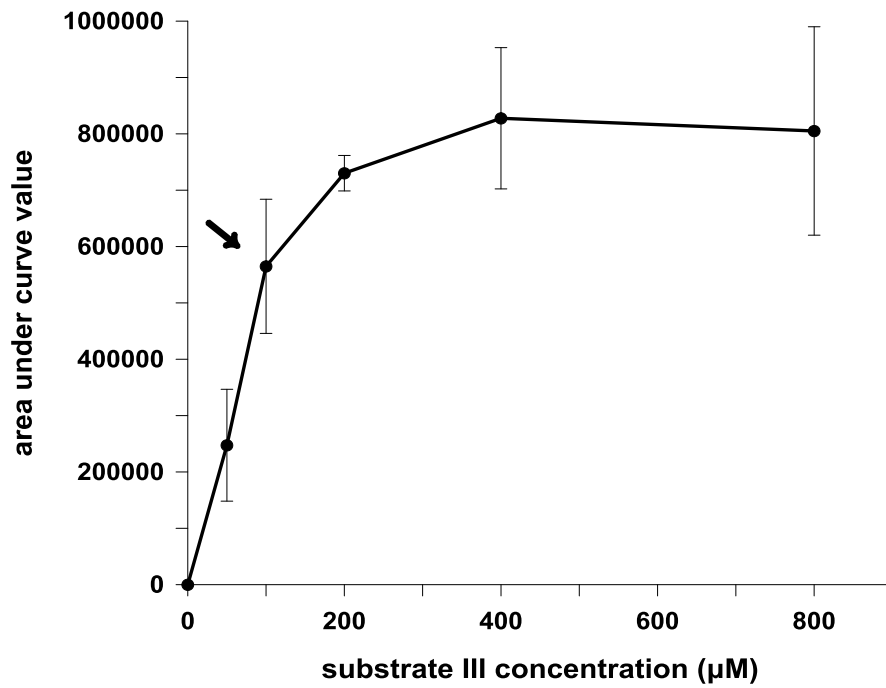


Fig. 4. Determination of proteasome substrate III concentration.
Substrate III; proteasome substrate III.

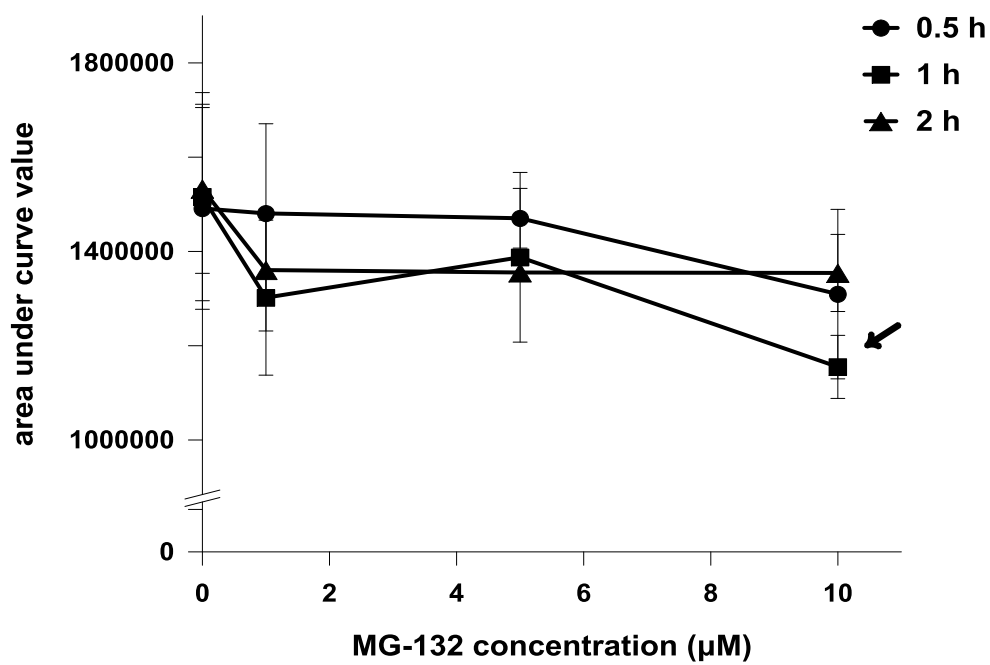


Fig. 5. Determination of MG-132 concentration and reaction time.

2. 기존의 proteasome 역가 측정법과 CPA assay를 이용해 측정된 flavonoid proteasome 역가 저해율 비교 및 triterpenoid의 proteasome 역가 저해율 확인

기존의 proteasome 역가 측정법 (CE assay)을 이용하여 flavonoid 200 μ M 의 proteasome 역가 저해율을 측정한 실험에서는 EGCG (45.21 %), kaempferol (68.29 %), baicalin (78.47 %), MG-132 (79.66 %, 100 μ M), hispidulin (82.06 %), baicalein (84.03 %), myricetin (84.50 %)순으로 proteasome 저해 활성을 보고하였으며, Fig. 6의 CE assay 결과는 MG-132의 proteasome 저해 활성을 100 %로 환산하여 나타내었다.

반면, CPA assay를 이용하여 측정한 결과는 CE assay의 결과와 다른 경향을 나타냈다 (Fig. 6). CPA assay를 이용하여 측정한 flavonoid (10 μ M, 100 μ M)의 proteasome 역가 저해율은 baicalin (17.4 \pm 4.0 %, 21.2 \pm 7.6 %), hispidulin (19.7 \pm 1.1 %, 22.7 \pm 3.2 %), baicalein (13.1 \pm 2.5 %, 28.1 \pm 2.5 %), kaempferol (17.6 \pm 4.0 %, 31.3 \pm 4.0 %), myricetin (36.4 \pm 8.8 %, 46.3 \pm 9.7 %), EGCG (50.4 \pm 3.7 %, 68.4 \pm 3.8 %) 순으로 높게 나타났다.

CE assay와 비교하여 CPA assay 에서 flavonoid의 proteasome 역가 저해율이 더 낮아지거나 경향이 다르게 나타난 이유는 2가지를 생각해 볼 수 있다. 우선, CE assay에서는 측정에 사용한 flavonoid의 농도가 200 μ M로 CPA assay에서 측정한 10 μ M, 100 μ M보다 더 높았기 때문에 CPA assay에서의 proteasome 역가 저해율이 더 낮게 나타난 것으로 생각할 수 있다. 또한 CE assay와 CPA assay의 proteasome 역가 저해율의 경향이 다르게 나타난 이유는 flavonoid가 세포막과 상호작용하는 물리적 특성으로 설명할 수 있다. 즉, 친유성의 flavonoid는 인지질로 구성되어 있는 세포막 안으로 깊게 들어갈 수 있기 때문에

세포막을 통과함으로써 세포에 흡수되어 세포질에 존재하는 proteasome의 단백질 분해 활성을 저하시킬 수 있으며, flavonoid 마다 세포 투과성 및 proteasome 역가 저해율이 다르기 때문에 세포 투과성을 고려한 CPA assay와 세포 투과성을 고려하지 않는 CE assay의 측정 결과가 다르게 나타났음을 알 수 있다 [33].

따라서 myricetin과 EGCG는 세포 투과성과 대사를 고려한 CPA assay로 proteasome 역가를 측정하였을 때, 다른 flavonoid 시료에 비해 proteasome 역가 저해율이 유의하게 높게 나타났으며 ($p < 0.05$), 이를 통해 myricetin과 EGCG는 proteasome 저해 활성이 우수한 flavonoid임을 확인하였다.

Triterpenoid ($10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$)의 proteasome 역가 저해율 또한 CPA assay로 측정하였고, ursolic acid ($25.9 \pm 8.8 \%$, $26.9 \pm 8.9 \%$), oleanolic acid ($7.2 \pm 8.5 \%$, $29.2 \pm 4.9 \%$), betulinic acid ($25.7 \pm 15.7 \%$, $56.4 \pm 3.8 \%$) 순으로 proteasome 역가 저해율이 높게 나타났으며, betulinic acid는 측정된 다른 triterpenoid와 비교하여 proteasome 역가 저해율이 유의하게 높았다 ($p < 0.05$) (Fig. 7).

따라서 CPA assay를 이용하여 측정한 flavonoid와 triterpenoid의 proteasome 역가 저해 실험 결과를 통해, proteasome 저해제로서 flavonoid 및 triterpenoid의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

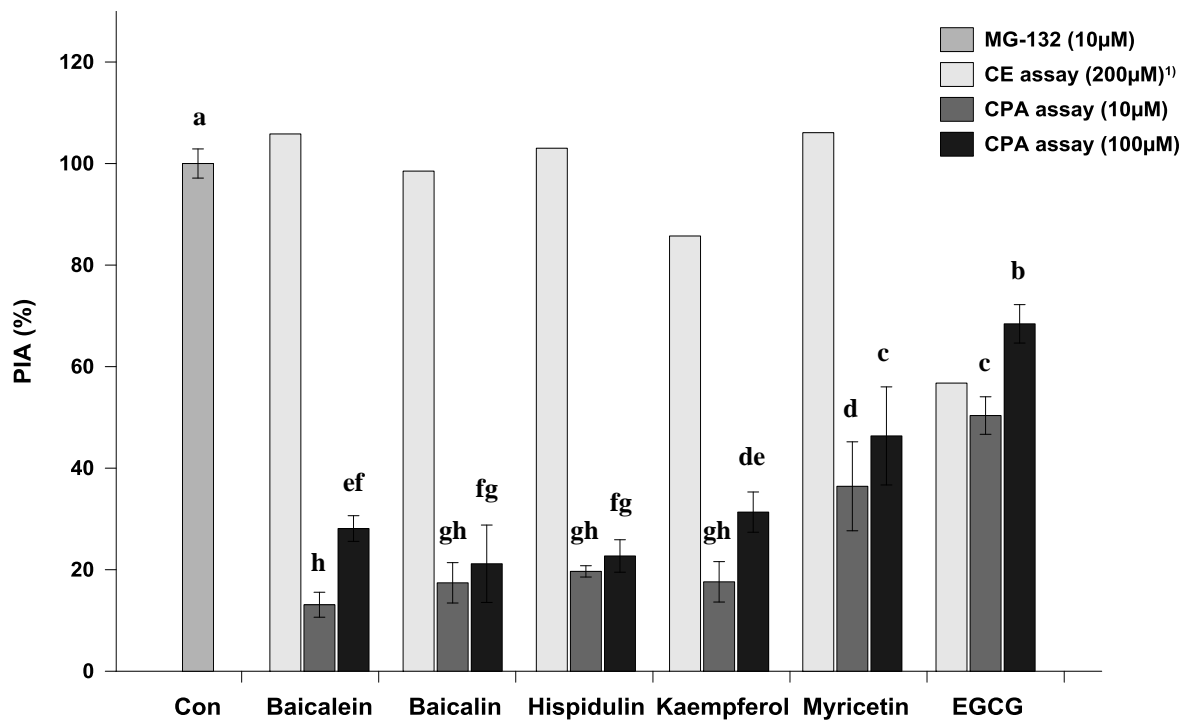


Fig. 6. Proteasome inhibition activities of selected flavonoids.

PIA; proteasome inhibition activity, CE; cell extract proteasome activity, CPA; cellular proteasome activity, Con; control, EGCG; (-)-epigallocatechin gallate. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

¹⁾ Proteasome inhibition activity of flavonoids using the existing cell extract proteasome activity assay [32]

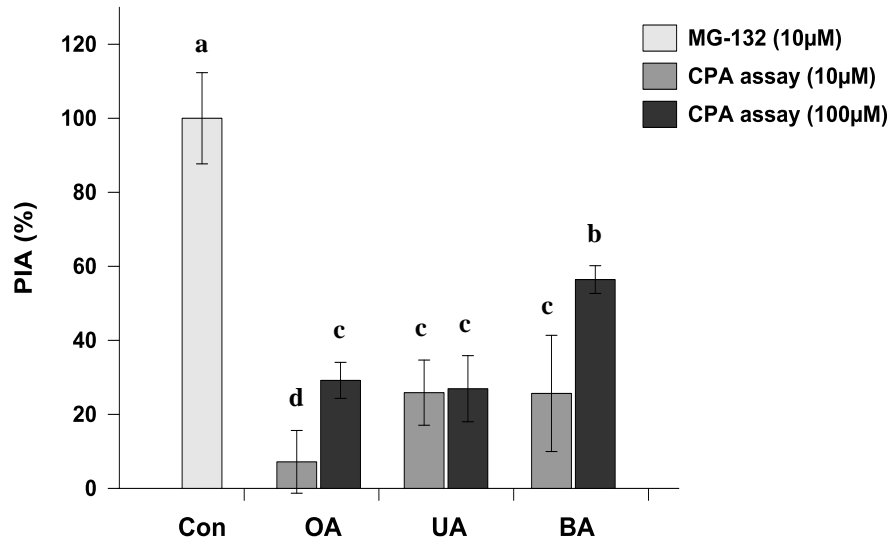


Fig. 7. Proteasome inhibition activities of selected triterpenoids. PIA; proteasome inhibition activity, CPA; cellular proteasome activity, Con; control, OA; oleanolic acid, UA; ursolic acid, BA; betulinic acid. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$)

IV. 결 론

본 연구를 통해 개발한 세포 기반 proteasome 역가 측정법 (CPA assay)은 기존의 세포 추출액으로 proteasome 역가를 측정한 방법보다 생명체의 대사 조건과 유사한 환경을 조성함으로써 시험 시료의 세포 투과성, 흡수 및 대사를 고려하여 proteasome 역가 저해율을 측정할 수 있다.

또한, CPA assay를 통해 식품 속에 존재하는 proteasome 저해제를 비교적 간단하게 스크리닝함으로써, 잠재적 proteasome 저해제 발견에 도움을 줄 것이다.

Chapter 2

Proteasome 역가 저해를 이용한 차류의 항암 효과 연구

I. 서 론

세포주기 (cell cycle)는 세포의 성장 및 증식, 손상된 DNA 회복 등을 조절하는 복합적인 과정을 의미하며, 세포주기는 G1, S, G2, M기인 4기로 구분된다. G1기는 DNA의 합성을 준비하는 시기이고, S기는 DNA를 합성하는 시기이므로 $2n-4n$ 사이의 DNA 함량을 갖는다. G2기는 S기와 M기 사이에 존재하고 분열을 준비하는 시기이며, M기는 세포가 딸세포 2 개를 형성하기 위해 분열하는 시기이다. 또한 G0기는 세포분열이 일어나지 않는 휴지기의 세포를 의미한다 [34, 35]. 세포주기는 cyclin-dependent kinases (CDKs)와 cyclins 단백질의 복합체에 의해 조절되며, 각 단계에 필요로 되는 CDK-cyclin 복합체는 다르다 (Fig. 8). 각 단계에 필요한 CDK-cyclin 복합체가 충족이 된 후에는 ubiquitin-proteasome system (UPS)에 의해 cyclin 단백질이 분해되어 다음 단계로 세포주기가 진행할 수 있도록 해준다 [28, 35, 36]. 하지만, proteasome의 활성이 억제되어 이러한 cyclin 단백질의 축적이 일어나면 세포주기는 중단되며 세포 증식이 이루어지지 않기 때문에 세포가 사멸한다 [19]. 따라서, proteasome 억제는 세포주기를 차단함으로써 증식을 억제하여 항암 효과를 나타낼 수 있다.

Nuclear factor κ B (NF- κ B)는 DNA에 결합하여 세포자가사멸 (apoptosis), 세포 증식, 분화, 면역반응 및 염증반응과 관련된 다양한 유전자 발현을 조절하는 전사인자이며, 특히 NF- κ B 활성형은 세포주기를 조절하는 cyclin D 단백질 및 세포자가사멸 억제 단백질인 Bcl-2와 Bcl-xL 단백질 발현을 증가시키기 때문에 세포 증식 증가 및 세포자가사멸 억제에 의한 암 발생과 연관이 있다 [37-40]. 또한 NF- κ B는 5 개의 subunit (RelA(p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50/p105),

NF- κ B2 (p52/p100))이 homodimer 혹은 heterodimer로 존재하며, p65-p50 heterodimer가 가장 대표적인 NF- κ B dimer (이량체)이다 [41, 42]. 외부 자극이 없을 때, NF- κ B는 I κ B- α (inhibitor of NF- κ B)와 결합하여 불활성형으로 세포질에 존재하며, UPS에 의해 활성이 조절된다 [12]. 박테리아, 바이러스, 염증성 사이토카인, 성장 인자, 자외선, 산화 스트레스를 포함하는 다양한 세포의 자극은 IKK (I κ B kinase)에 의해 I κ B- α 의 인산화를 유발하고, 연속적으로 I κ B- α 는 UPS에 의해 유비퀴틴화되어 proteasome에 의해 분해됨으로써 I κ B- α 와 결합되어 있던 NF- κ B는 떨어져 나와 핵으로 들어가 활성형이 되면서 DNA와 결합하여 cyclin D와 Bcl-2와 같은 다양한 유전자 발현을 조절한다 [43]. 따라서 proteasome의 억제는 I κ B- α 를 축적시켜 NF- κ B를 세포질에 불활성형으로 존재하게 함으로써 암세포의 세포자가사멸 및 세포주기 저해 (cell cycle arrest)를 일으키기 때문에 항암 효과를 나타낼 수 있다.

본 연구에서는 flavonoid 및 triterpenoid가 많이 포함되어 있다고 밝혀진 차류의 proteasome 저해 활성을 스크리닝한 후, proteasome 저해 효과가 높게 나타난 차류를 선정하여 이들의 항암 효과를 확인하고자 하였다. 차류의 성분 및 기능성과 관련된 선행연구들을 살펴보면 다음과 같다.

먼저 감잎은 아미노산, 당, 탄닌, 비타민 A, carotenoids, flavonoids, triterpenoids가 풍부하게 들어있으며 [44-47], 항종양 효과 [48], 항산화 및 항유전독 효과 [49], 혈압 강하 [46], 항돌연변이 [50, 51], angiotensin-converting enzyme 및 DNA polymerase 활성 저해 효과 [52, 53] 등을 갖는다고 보고되었다.

녹차는 carotenoids, chlorophyll, cellulose, polysaccharides 및 가장 많이 알려진 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)를 포함한 catechins과 kaempferol, quercetin, myricetin을 포함한 flavonols, caffeine과 같은 생리활성을 나타내는 다양한

polyphenol이 들어있으며 [54-56], 항균작용 [57], 항산화 활성 [58], 콜레스테롤 저하 [59], 항암 효과 [60] 등에 대한 연구가 보고되었다.

솔잎에는 식이섬유소, 탄닌, alkaloids, chlorophyll, carotene, terpenoids, phenolic compounds의 생리 활성 물질이 포함되어 있으며 [61], 솔잎은 혈청 지질 저하 효과 [62-64], 항변이원성 및 항산화 [62], 항돌연변이 [65], 항균성 [66], 항암 효과 [67] 등에 대한 연구 결과가 보고되었다. 이처럼 감잎, 녹차잎, 솔잎의 항암성 및 항산화 효과를 포함한 다양한 기능성에 대한 연구는 많이 진행되었지만, proteasome 저해 효과에 대한 연구는 수행되지 않았음을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 flavonoid 및 triterpenoid가 풍부하게 함유되어 있지만, proteasome 저해 효과에 대한 연구가 보고되지 않은 차류를 대상으로 앞서 개발한 CPA assay에 적용하여 proteasome 역가를 스크리닝한 후, proteasome 저해 활성이 높은 차류 3종을 선정하고, 농도에 따른 proteasome 역가 저해율 변화, 간암세포의 증식 억제, cell cycle 및 NF- κ B 발현량에 미치는 영향을 확인해 봄으로써 차류의 항암 효과를 연구해 보고자 하였다.

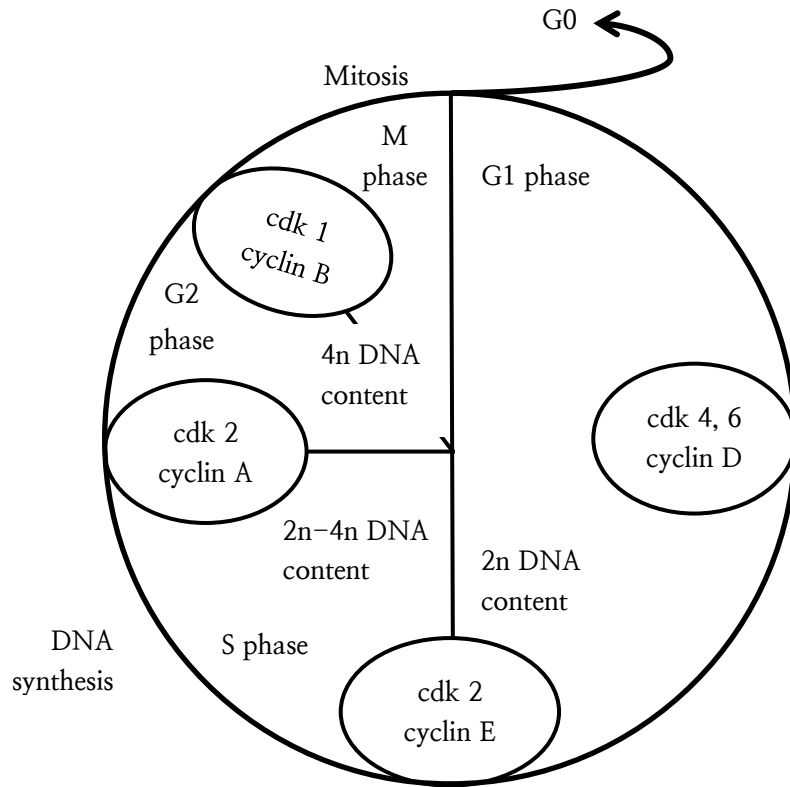


Fig. 8. Cell cycle.

Progression through the cell cycle is regulated by different CDK-cyclin complexes.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1.1. 시료

Proteasome 역가 스크리닝을 위해 proteasome 저해제로 알려진 flavonoid와 triterpenoid가 풍부하게 들어있는 6가지 차류를 선정하였다. 6가지 차류인 감잎 (*Diospyros kaki* Thumb.), 녹차잎 (*Camellia sinensis* O. Kuntze), 박하잎 (*Mentha arvensis* var. *piperascens*), 뽕잎 (*Morus alba* L.), 솔잎 (*pinus densiflora* Siebold et Zucc.), 자소엽 (*Perilla frutescens* var. *acuta*)은 2015년 4월 7일 서울 경동시장에 위치한 한약방에서 구입하였고, 구입 후 -20 °C에 보관하며 실험에 사용하였다.

1.2. 시약 및 기기

세포 배양에 사용된 2.00 mM L-Glutamine과 Earle's balanced salts가 포함되어 있는 MEM배지는 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)과 phenol red가 포함되지 않은 MEM 배지는 Gibco (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 배지에 첨가한 penicillin-streptomycin과 trypsin-EDTA solution 및 MTT assay에 사용한 Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) 시약은 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 찻잎 추출에

사용한 Acetone은 Daejung (Gyeonggido, Korea)에서 구입하여 사용하였다. CPA assay에 사용된 MG-132와 proteasome substrate III (fluorogenic)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, FACs 분석에 사용된 Propidium iodide solution (PI)는 Sony biotechnology (Oak St., Champaign, USA)에서 구입하였고, Triton X-100과 Ribonuclease A from bovine pancreas (RNase)는 sigma-aldrich에서 구입하였다. Western blot에 사용한 primary antibody인 NF- κ B p65는 Santa cruz biotechnology (Santa cruz, CA, USA)에서 구입하였고, Anti-Nucleolin은 Millipore (Str. 250, Frankfurter, Germany)에서 구입하였으며, secondary antibody인 Anti-mouse IgG (HRP-linked antibody)와 Anti-biotin (HRP-linked antibody)은 Cell signaling (Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. western blot detection kit인 ECL solution은 Elpis-biotech (Taejeon, Korea)에서 구입하였고, 단백질 정량에 사용한 DC Protein kit I은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였으며, Immobilon-P transfer membrane은 Millipore (Billerica, MA, USA, PVDF)에서 구입하였다. 또한 Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Aprotinin bovine, Leupeptin hydrochloride, Pepstatin A, DL-Dithiothreitol (DTT), Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), Igepal CA-630 (Igepal), Phosphate Buffered Saline (PBS)를 포함한 이 외의 시약들은 Sigma-aldrich에서 구입하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 homogenizer (Tops, 대일랩서비스, Korea), Aspirator (A-3S, Eyela, Japan), 회전 증발 농축기 (N-N Series, Eyela, Japan), 동결 건조기 (TFD Series, Ilshinbiobase, Korea), CO₂ incubator (371, Thermo, USA), multimode microplate reader (SpectraMax M5/M5^e, Molecular devices, USA), 원심분리기 (GZ-1312, Gyrozen, Korea), waving shaker (CWS-250, JEIO TECH,

Korea), Flow cytometry (LE-SH800ZE, Sony corporation, Japan), 전기영동장치 (1658004, Bio-Rad, USA) 이다.

2. 실험 방법

2.1. 차 추출 및 분말 획득

차에 존재하는 유용 성분을 추출하는 방법은 선행연구를 참고하여 수행하였다 [68]. 찻잎의 무게를 25 g 잰 후, 미리 냉각시켜둔 200 g의 80 % acetone (v/v)과 5분간 blender로 갈아준 다음 homogenizer를 사용하여 3분간 균질화하였다. 그 후 aspirator를 이용하여 No. 2 whatman 여과지로 진공 여과하였고, 얻어진 여과액을 회전 증발 농축기를 사용하여 45 °C에서 약 90 % 증발 농축하여 농축액을 만들었다. 농축액은 -80 °C에서 24시간 동결시킨 후, 동결 건조하여 약 2.28 g의 찻잎 추출 분말을 획득하였고, 분말은 사용할 때까지 -20 °C에 보관하였다.

2.2. Hep G2 세포 배양

인간 유래 간암 세포주인 Hep G2 cell (human hepatocarcinoma cell line)은 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 배양 조건은 MEM 배지에 10 % FBS와 1 % penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 세포 배양에 사용하였고, 세포는 T 25 혹은 T 75 flask에 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 배지는 3 - 4일에 한 번씩 교환하였고, flask에 세포가 70 - 80 % 자라면 trypsin-EDTA solution을 처리하여 세포를 떼어준 후, 1:3으로 계대 배양하였다.

2.3. CPA assay 적용

차류 6종-박하잎, 뽕잎, 자소엽, 감잎, 녹차잎, 솔잎-에서 얻은 분말을 10 µg/mL, 100 µg/mL의 농도로 만든 후, 개발한 CPA assay를 적용하여 proteasome 역가 저해율을 확인하고자 스크리닝을 수행하였다. 또한, 스크리닝 수행 후 proteasome 역가 저해율이 높게 나타난 찻잎 3종을 선정하여 0, 1, 10, 50, 100 µg/mL 의 농도로 Hep G2 cell에 처리함으로써 농도에 따른 proteasome 역가의 변화가 나타나는지를 확인하였다.

2.4. Cytotoxicity

세포 독성 실험은 선행 연구를 참고하여 MTT assay를 수행하였다 [69]. Hep G2 cell을 96-well plate에 6×10^4 cell/well의 농도로 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 버리고 PBS로 1회 세척하고, 시험 시료를 각각 0, 1, 10, 30, 50, 70, $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 free MEM 배지에 희석하여 처리한 후 다시 24시간 동안 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하고 well당 0.5 mg/mL 의 농도로 제조한 MTT 용액을 넣어 4시간 동안 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 배양하면서 미토콘드리아의 환원반응을 유도하였다. 4시간 후 미토콘드리아의 환원반응으로 생성된 보라색의 formazan 결정을 용해시키기 위해 acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) 용액을 제조하여 각 well에 넣어준 후 20시간 동안 실온에서 waving shaker로 조심히 교반하였다. 20시간 후에는 microplate reader를 이용하여 발색 정도를 590 nm에서 측정하였다. 측정된 흡광도 (absorbance) 값은 다음의 식에 대입하여 세포 독성률을 구하였다.

$$\text{cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

2.5. Cell proliferation

세포 증식 실험은 선행 연구를 참고하여 MTT assay를 수행하였다 [69, 70]. Hep G2 cell을 96-well plate에 4×10^4 cell/well의 농도로 200 μ L씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 배지를 버리고 PBS로 1회 세척하고, 시험 시료를 각각 0, 1, 10, 30, 50, 70, 100 μ g/mL의 농도로 free MEM 배지에 희석하여 처리한 후 96시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 96시간 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하고 well당 0.5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액을 넣어 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하면서 미토콘드리아의 환원반응을 유도하였다. 4시간 후 미토콘드리아의 환원반응으로 생성된 보라색의 formazan 결정을 용해시키기 위해 acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) 용액을 제조하여 각 well에 넣어준 후 20시간 동안 실온에서 waving shaker로 조심히 교반하였다. 20시간 후에는 microplate reader를 이용하여 발색 정도를 590 nm에서 측정하였다. 측정된 흡광도 (absorbance) 값은 다음의 식에 대입하여 세포 증식률을 구하였다.

$$\text{cell proliferation (\%)} = \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

2.6. Cell cycle analysis

유세포 분석기 (flow cytometry)를 이용하여 cell cycle을 분석하는 방법은 cell cycle analysis protocol을 참고하여 수행하였다 [71]. Hep G2 cell을 6-well plate에 1×10^6 cell/well (2 wells/treatment)의 농도로 1 mL씩 분주하고 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 버리고 PBS로 1회 세척하고 free MEM 배지에 0, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 희석한 시험시료 (2 wells/treatment)를 1 mL씩 넣은 후 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후에 반응시킨 cell을 시료별로 모아 130 g, 4 °C에서 4분간 원심 분리하여 cell pellet을 얻고 PBS로 2회 세척한 후 70 % ethanol로 -20 °C에서 적어도 2시간 이상 고정시켰다. 고정시킨 cell을 PBS로 2회 세척하고, PBS 0.1 mL에 resuspension시킨 후 0.1 % Triton X-100, 200 μ g/mL RNase를 넣어 어두운 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, PI (0.5 mg/mL) 용액을 첨가하였고, ice box에서 빛을 차단하여 15분간 반응시킨 후 PBS로 1회 세척하여 flow cytometry를 이용하여 488 nm excitation에서 cell cycle을 분석하였다.

2.7. Western blot

감염, 녹차잎, 솔잎의 NF- κ B 발현량 억제 효과를 western blot으로 확인하기 위해 TNF- α -induced NF- κ B activation model을 사용하였다 [43]. Hep G2 cell을 6-well plate에 1×10^6 cell/well (2 wells/treatment)의 농도로 1 mL씩 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하고 free MEM 배지에 시험시료를 0, 1, 10, 100 μ g/mL의 농도로 희석하여 처리하였고, 24시간 동안 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척한 후 10 ng/mL의 농도로 희석한 TNF- α 를 넣어주어 30분간 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 반응시켰다. 30분 후에 반응시킨 cell들을 회수하여 세포질 추출물과 핵 추출물을 얻는 과정은 선행연구를 참고하여 수행하였다 [72-74].

세포는 차가운 PBS로 2회 씻어주고 얼음 위에서 scraper를 이용하여 세포를 떼어낸 후 4 °C에서 130 g로 5분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 cell 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 DTT, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin]과 섞어 현탁액을 만들어 주고 얼음에 15분간 방치한 후 10 % Igepal을 첨가하여 vortexer로 15초간 강하게 섞어주었다. 이 현탁액은 4 °C에서 12,000 g로 3분간 원심분리하였고, 상층액인 세포질 추출액은 따로 모아서 -80 °C에 보관하였다.

상층액을 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 DTT, 1 μ g/mL

aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin]를 넣고 4 °C에서 30분간 waving shaker로 교반하여 핵막을 깬 후, 4 °C, 12,000 g 로 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 상층액은 핵 추출액으로서 단백질량용과 로딩용으로 나누어 사용하기 전까지 -80 °C에 보관하였다.

핵 추출액은 Bio-Rad의 DC Protein Kit I을 사용하여 단백질 정량을 수행하였고, 단백 정량 후 시료들의 단백질 양을 동일하게 조절하여 2X sample buffer와 1:1로 섞어 전처리하였다. 전처리 한 시료들을 10 % (w/v) SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후 PVDF transfer membrane으로 gel의 단백질을 transfer 시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 3 % non-fat dry milk in 0.1 % PBST (PBS-Tween 20) (w/v)으로 실온에서 1시간 동안 waving shaker로 교반하며 blocking 한 후, NF- κ B p65 (1:250), anti-nucleolin (1:5000)를 4 °C에서 24시간 교반하여 primary antibody를 붙여주었다. Primary antibody를 붙여준 후, 0.1 % PBST로 5분 간격으로 3회 세척하였고, secondary antibody인 Anti-mouse IgG (1:1000)와 Anti-biotin (1:5000)을 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 다시 0.1 % PBST로 membrane을 5분 간격으로 4회 세척한 후 ECL 용액을 처리하여 NF- κ B와 nucleolin band를 얻어 정량하였다.

2.8. 통계 처리

본 실험의 결과는 적어도 3번 반복하여 평균±표준편차로 나타내었고, 실험 결과는 SPSS software version 22 (IBM, Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 실시함으로써 실험군과 대조군 간의 차이에 대한 통계적 유의성을 확인하였고, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 수행하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. CPA assay 적용

1.1. 차류의 proteasome 역가 저해율 스크리닝

Proteasome 저해 효과가 있다고 알려진 flavonoid와 triterpenoid가 차류에 많이 존재한다는 사실을 바탕으로 6가지 차류 (박하잎, 뽕잎, 자소엽, 감잎, 녹차잎, 솔잎)를 구입하여 proteasome 역가 저해율을 스크리닝하였고, Fig. 9에 스크리닝 수행 결과를 나타냈다. 스크리닝 결과, 6가지 차류 중 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 감잎 ($39.5 \pm 3.1 \%$), 녹차잎 ($34.3 \pm 6.7 \%$), 솔잎 ($46.4 \pm 5.7 \%$)의 proteasome 역가 저해율이 다른 시료와 비교하여 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 따라서 proteasome 역가 저해율이 높게 나타난 감잎, 녹차잎, 솔잎을 선정하여 농도 변화에 따른 proteasome 저해 활성 효과를 바탕으로 proteasome 저해가 암세포에 미치는 영향을 세포신호전달을 통해 그 작용 기작을 밝힘으로써 차류의 항암효과를 살펴보고자 하였다.

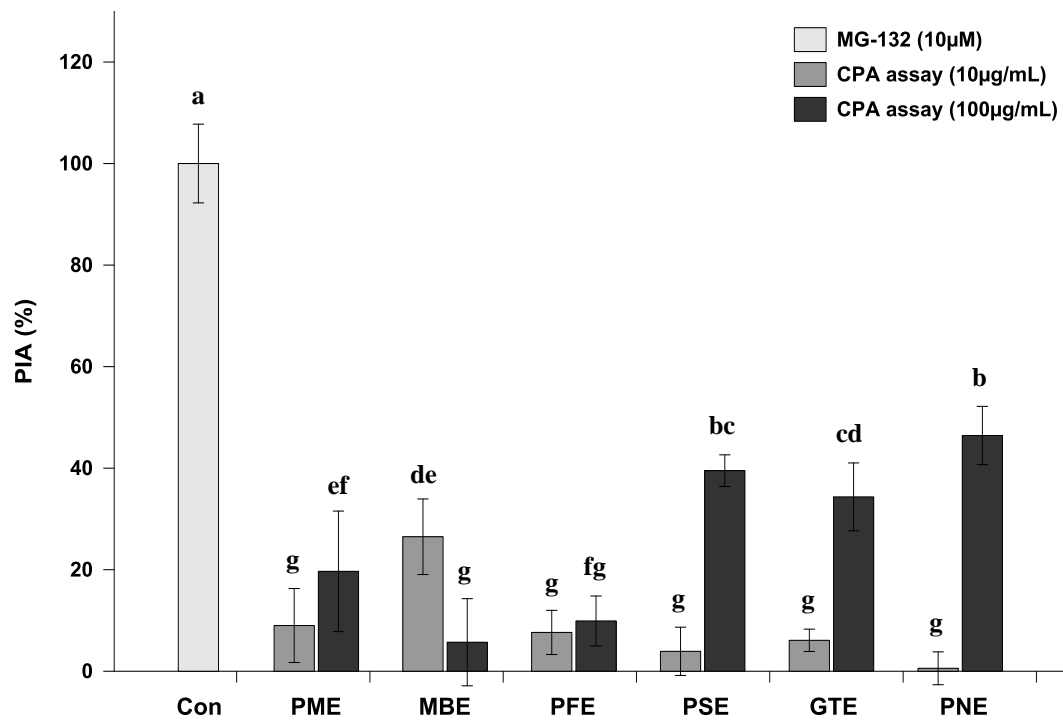


Fig. 9. Proteasome inhibition activities screening of selected tea leaves extracts. PIA; proteasome inhibition activity, CPA; cellular proteasome activity, Con; control, PME; peppermint extract, MBE; mulberry leaves extract, PFE; perilla frutescens extract, PSE; persimmon leaves extract, GTE; green tea leaves extract, PNE; pine needles extract.

1.2. 감잎, 녹차잎, 솔잎의 농도별 proteasome 역가 저해율

감잎, 녹차잎, 솔잎을 Hep G2 cell에 0, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 CPA assay를 수행하였고 (Fig. 10A, B, C), 3 가지 차류 모두 농도-의존적으로 proteasome 역가를 저해하였다 ($p < 0.05$). 감잎, 녹차잎, 솔잎에서 proteasome 역가 저해율이 높게 나타난 것은 proteasome 저해 효과가 보고되었던 flavonoid와 triterpenoid에 의한 것으로 생각된다 [32]. 즉, 감잎에 존재하는 kaempferol, myricetin, quercetin 등의 flavonoid와 triterpenoid인 betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid [44]가 proteasome 역가 저해에 기여했을 것이라 생각된다. 녹차잎은 이미 잘 알려진 EGCG를 포함한 다양한 polyphenol의 생리활성에 의해 proteasome 역가 저해가 나타났다고 생각되며, 솔잎은 proteasome 저해 효과가 보고된 quercetin과 kaempferol 및 다양한 flavonoid를 함유하고 있기에 [75] 이들 성분이 솔잎의 proteasome 역가 저해에 기여했을 것이라 생각된다.

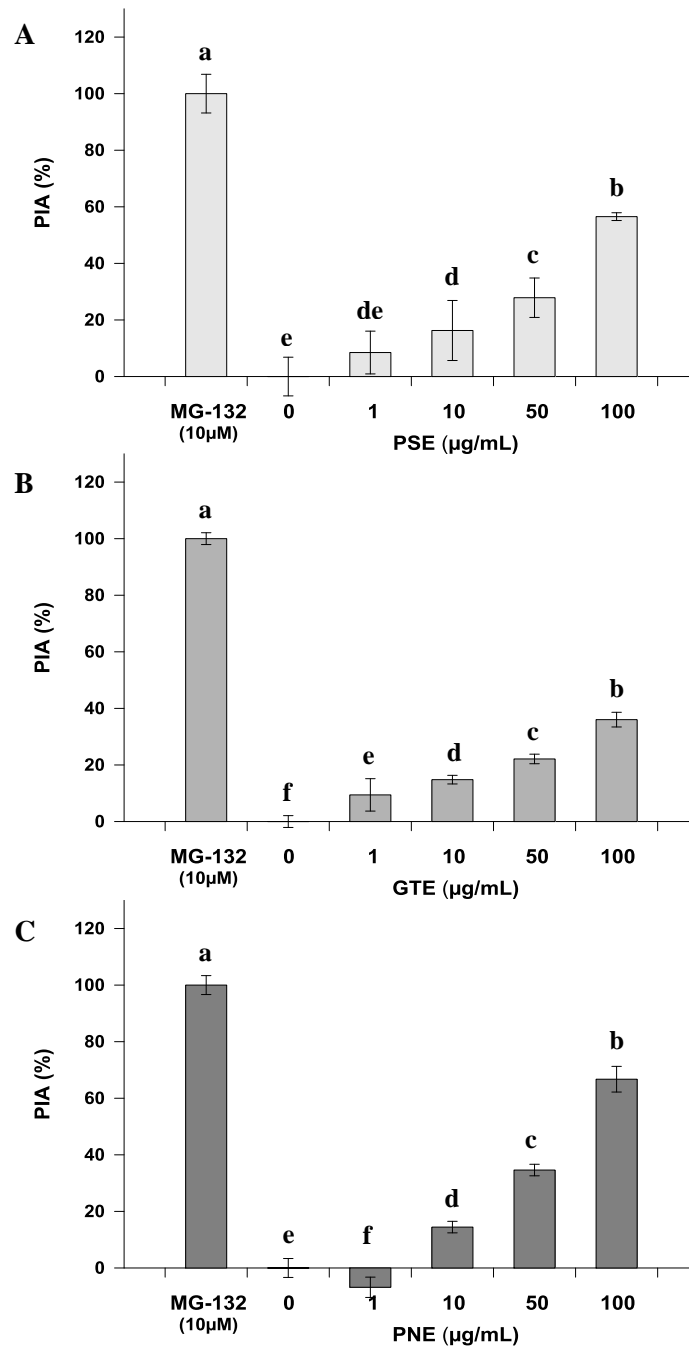


Fig. 10. Proteasome inhibition activities of PSE (A), GTE (B), PNE (C). PIA; proteasome inhibition activity, Con; control, PSE; persimmon leaves extract, GTE; green tea leaves extract, PNE; pine needles extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

2. Cytotoxicity

세포 독성률 (cytotoxicity)은 시험 시료를 농도별로 세포에 24시간 처리하였을 때 시료가 세포에 급성 독성을 나타내는지를 확인하는 실험으로써 세포 독성이 10 % 이상인 경우에는 급성 독성을 나타낸다고 보았다. 따라서 cytotoxicity 실험 결과를 바탕으로 세포 독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 처리 농도를 정하기 위해 실험을 수행하였다. Cytotoxicity 실험의 결과, 감잎, 녹차잎, 솔잎을 0 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 다양한 농도로 Hep G2 cell에 처리하였으나, 모든 농도에서 세포 독성률이 10 % 미만으로 나타났다 (Fig. 11A). 이를 통해 감잎, 녹차잎, 솔잎은 세포에 미치는 독성이 거의 없다고 할 수 있으며, 세포 독성이 나타나지 않은 0 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 내에서 모든 실험을 진행하였다.

3. Cell proliferation

세포 증식률 (cell proliferation)은 시험 시료를 농도별로 세포에 96시간 처리하여 시험 시료에 의한 세포 증식 변화를 확인하는 실험으로써, 암세포의 증식 억제는 항암 효과의 가능성을 확인하는 척도가 된다. Cell proliferation 실험은 cytotoxicity의 실험 결과에 따라 독성이 나타나지 않는 농도인 0, 1, 10, 30, 50, 70, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 Hep G2 cell에 처리하였고, 실험 결과는 Fig. 11B에 나타났다. Hep G2 cell에 감잎, 녹차잎, 솔잎을 농도별로 처리했을 때, 감잎과 솔잎은 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 증가하는 경향을 보이다가 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 세포 증식률이 감소하는 경향을 나타냈으며, 감잎은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도

이상에서 con ($0 \mu\text{g/mL}$)과 비교하여 유의적으로 감소하였고 ($p < 0.05$), $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도일 때 세포 증식률은 $75.9 \pm 5.1\%$ 로 Hep G2 cell의 증식을 저해하였다. 솔잎은 $50 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 con과 비교하여 세포 증식률이 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.05$), $100 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 $60.5 \pm 8.6\%$ 의 세포 증식률을 나타냈다. 녹차는 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 증식률이 약간 증가하다가 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 농도 이상에서는 농도-의존적으로 Hep G2 cell의 증식을 저해하였으며 ($p < 0.05$), $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 세포 증식률이 $33.4 \pm 1.4 \%$ 로 나타났다. 따라서 cell proliferation 실험을 통해 감잎, 녹차잎, 솔잎이 Hep G2 cell의 증식 억제에 미치는 효과를 확인할 수 있었다.

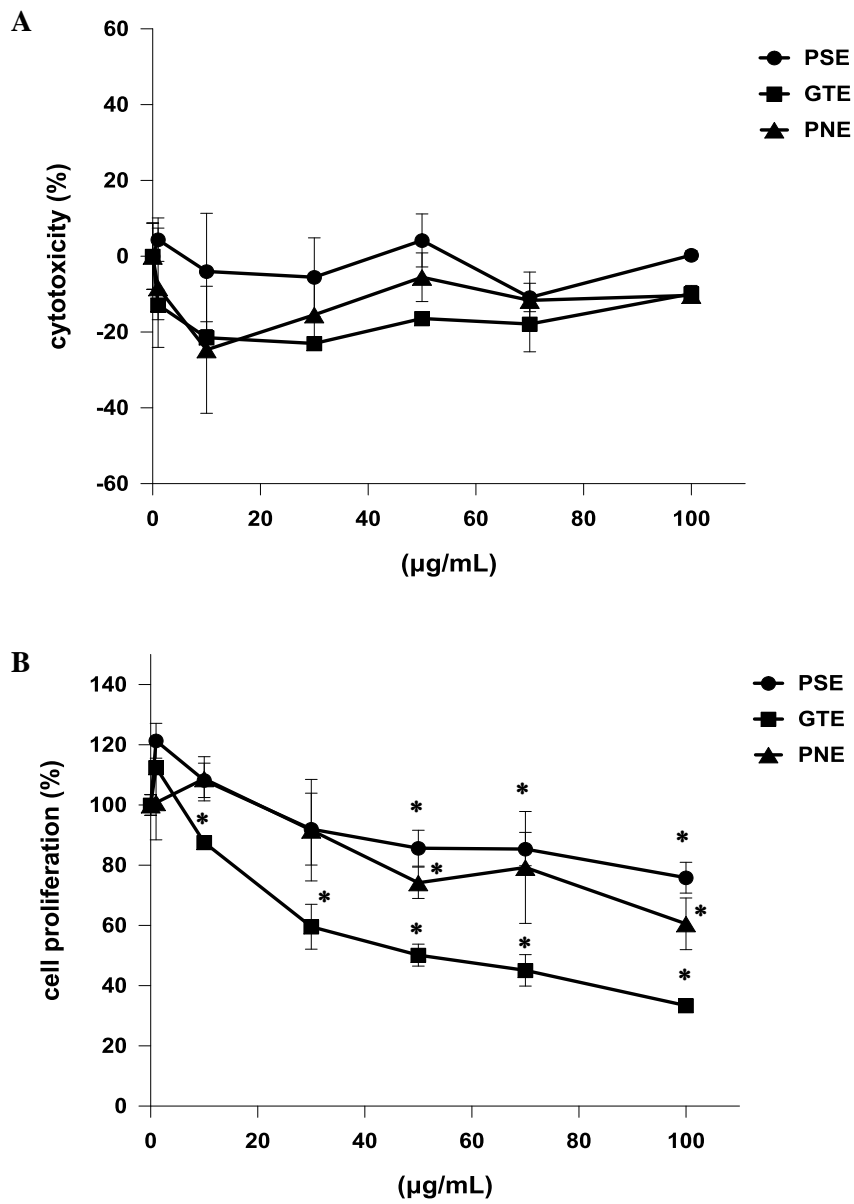


Fig. 11. Effects of persimmon leaves, green tea leaves, and pine needles extracts on cytotoxicity (A) and cell proliferation (B) in Hep G2 cells. PSE; persimmon leaves extract, GTE; green tea leaves extract, PNE; pine needles extract. An asterisk (*) indicates significant difference in cell proliferation compared to the control ($p < 0.05$).

4. Cell cycle

유세포 분석기 (Flow cytometry)를 사용한 cell cycle 분석은 세포에 존재하는 핵의 DNA를 propidium iodide (PI)로 염색하여 DNA 함량에 따라 세포주기를 파악하는 실험이다. 따라서 DNA 함량이 $2n$ 에 해당하는 경우는 G0/G1기로 구분하고, DNA를 합성하는 시기여서 DNA 함량이 $2n-4n$ 사이에 해당할 경우는 S기로 구분하며, DNA 합성을 완료하여 DNA 함량이 $4n$ 에 해당하는 경우는 G2/M기로 구분하였다. 또한 세포의 DNA 함량이 $2n$ 이 되지 않는 경우는 sub-G1기로 구분하였으며, sub-G1기는 세포자가사멸 (apoptosis)로 인한 DNA의 손실로 DNA 함량이 $2n$ 이 되지 않는 것일 수 있으며, apoptosis 진행 중 발생하는 apoptotic bodies, 크로마틴 (chromatin)의 파편, 죽은 세포의 깨진 염색체 (chromosome)나 핵으로 인해 $2n$ 이 되지 않는 세포가 분석될 수 있다 [71]. 따라서 sub-G1기가 발견되는 경우는 apoptosis의 가능성을 생각해 볼 수 있다.

감잎, 녹차잎, 솔잎을 Hep G2 cell에 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 반응시켜 cell cycle을 분석하였다. 우선 감잎 처리 후에 cell cycle 분석 결과 (Fig. 12), sub-G1기에서 감잎 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리하였을 때 con (0 $\mu\text{g/mL}$)과 비교하여 유의하게 증가하였고 ($p < 0.05$), G0/G1기의 경우는 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리했을 때 con에 비해 유의하게 감소하는 결과를 나타냈다. S기에서는 농도별로 유의한 차이를 나타내지 않았으며, G2/M기에서는 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리했을 때, con과 비교하여 유의하게 증가하는 결과를 나타냈다 ($p < 0.05$). 이전에 flavonoid의 cell cycle arrest와 관련된 연구 결과에 따르면, myricetin과 kaempferol이 각각 Hep G2 cell (간암 세포)과 HT-29 cell (대장암 세포)에서

cyclin B1의 발현을 억제하여 G2/M phase arrest를 유발한다고 보고되었다 [76, 77]. 그러므로 본 연구의 결과는 감잎에 존재하는 myricetin과 kaempferol을 포함하는 다양한 flavonoid [44]에 의해 proteasome이 저해됨에 따라 cell cycle arrest가 발생 혹은 flavonoid가 직접 cell cycle과 관련된 단백질 발현에 영향을 주어서 나타난 결과라 생각된다. 따라서 감잎은 농도가 증가할수록 G2/M기에서 cell cycle arrest를 유발하며, 감잎의 농도가 높을 때 sub-G1기를 유의적으로 증가시킨 결과를 통해 apoptosis 유발 가능성을 발견할 수 있었다.

녹차잎 처리 후에 cell cycle 분석 결과 (Fig. 13), 녹차잎 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리했을 때 sub-G1기가 con과 비교하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). G0/G1기의 경우 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리했을 때, con에 비해 유의하게 감소하는 결과를 나타냈다 ($p < 0.05$). S기는 con과 비교하여 녹차잎의 농도에 따라 농도-의존적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). G2/M기에서는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만 con과 비교하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 감잎과 마찬가지로 녹차의 cell cycle에 영향을 준 것은 녹차에 존재하는 flavonoid에 의한 결과라고 생각되며, 녹차의 주성분인 EGCG는 SMMC7721 cell (간암 세포), CL1-5 cell (폐암 세포)에서 S phase와 G2/M phase arrest를 유발한다고 보고된 바 있다 [78, 79]. 따라서 녹차잎은 EGCG를 포함하는 다양한 flavonoid에 의해 S phase arrest를 농도-의존적으로 일으키며, 농도가 높을 때 apoptosis를 일으킬 가능성이 있음을 확인하였다.

솔잎을 Hep G2 cell에 처리한 후의 cell cycle 분석 결과 (Fig. 14)는 G0/G1기에서 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리했을 때에만 con에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). S기에서는 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 con과 비교하여 유의하게 증가하는 결과를 나타냈으나 ($p < 0.05$), 농도별로는 유의한 차이가 나타나지

않았으며, G2/M기에서는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만 con에 비해 유의하게 증가하는 결과가 나타났다 ($p < 0.05$). 한편, 솔잎은 quercetin과 kaempferol이 주성분이라고 알려져 있으며 [75], quercetin은 LoVo cell (대장암 세포)과 MCF-7 cell (유방암 세포)에서 S phase arrest를 유발하고 [80], HeLa cell (자궁경부암 세포)에서는 G2/M phase arrest를 유발했으며 [81], kaempferol은 HT-29 cell에서 G2/M phase arrest를 유발했다고 보고되었다 [77]. 따라서 솔잎은 솔잎에 존재하는 다양한 flavonoid 성분 및 함량에 의해 S phase arrest를 농도 변화와 상관없이 일으켰으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 G2/M phase arrest를 일으킴을 확인하였다.

본 연구를 통해 감잎, 녹차잎, 솔잎이 cell cycle arrest를 유발시킨다는 것을 확인하였으나, cell cycle arrest 발생 시기가 다르게 나타난 이유는 각 차류에 존재하는 flavonoid 성분 및 함량이 다르기 때문으로 추정된다.

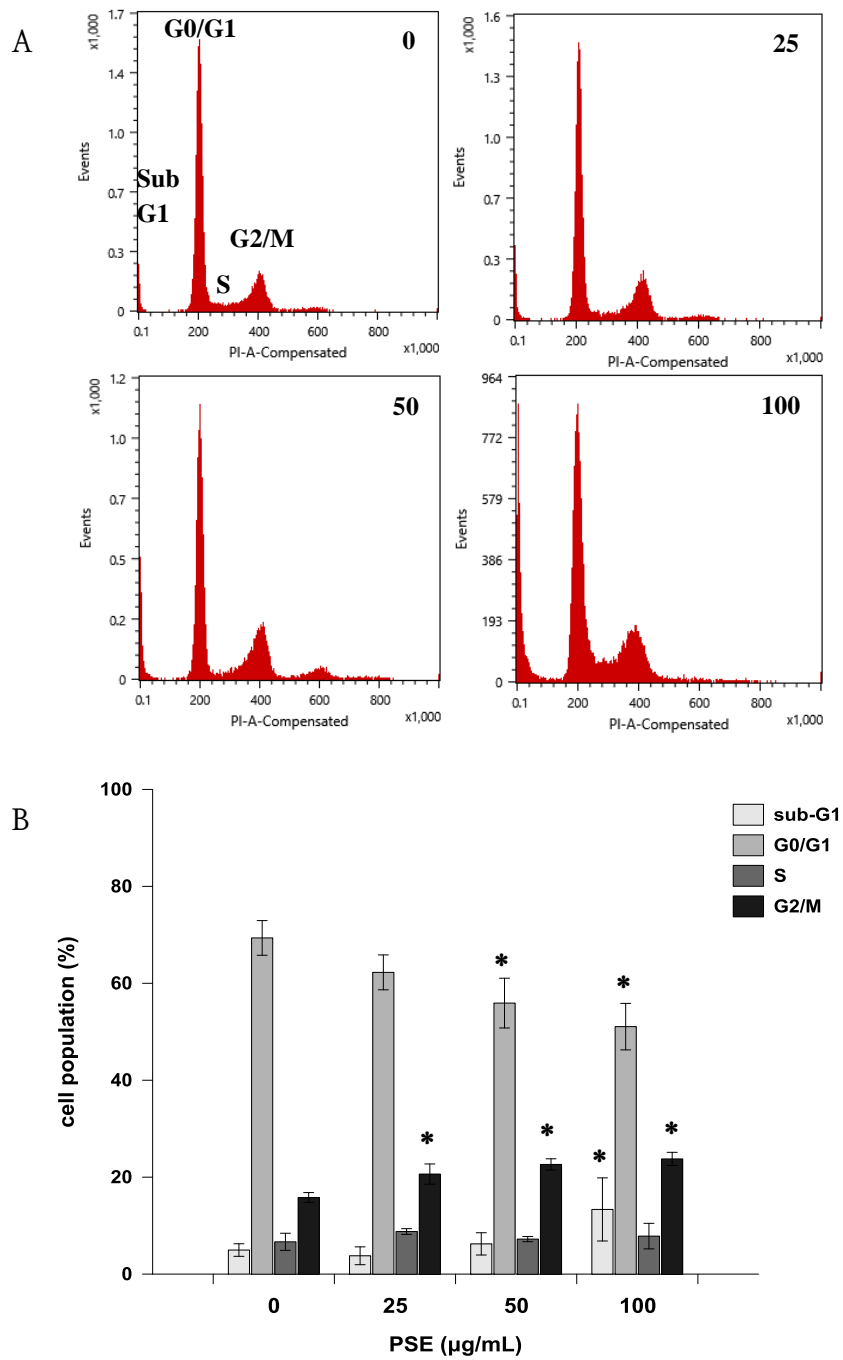


Fig. 12. Flow cytometric DNA content analysis of Hep G2 cells treated with PSE. Hep G2 cells were treated with PSE (0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h and stained with PI (A). The cell cycle was quantified (B). PSE; persimmon leaves extract. An asterisk (*) indicate significant differences in cell cycle compared to the control ($p < 0.05$)

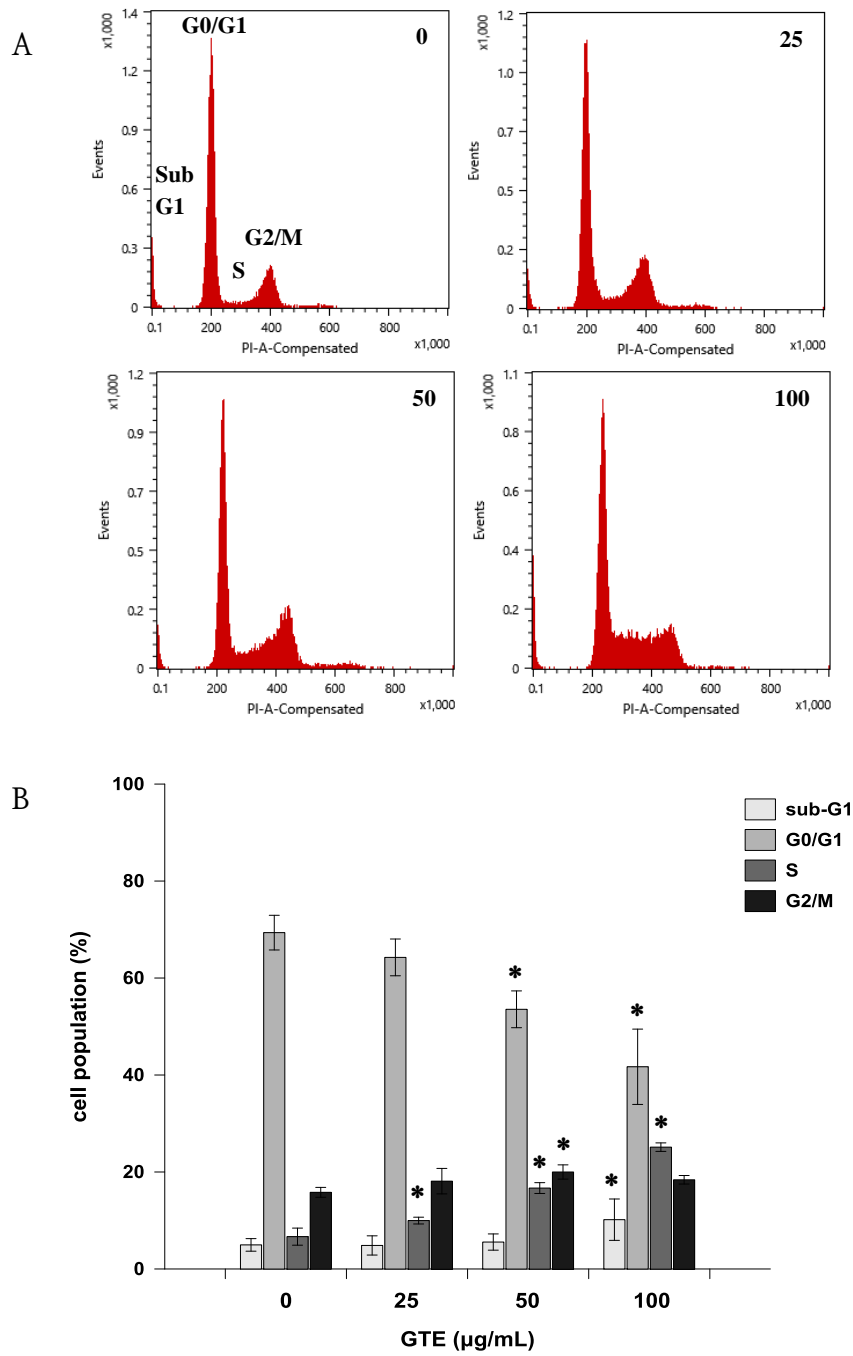


Fig. 13. Flow cytometric DNA content analysis of Hep G2 cells treated with GTE. Hep G2 cells were treated with GTE (0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h and stained with PI (A). The cell cycle was quantified (B). GTE; green tea leaves extract. An asterisk (*) indicate significant differences in cell cycle compared to the control ($p < 0.05$)

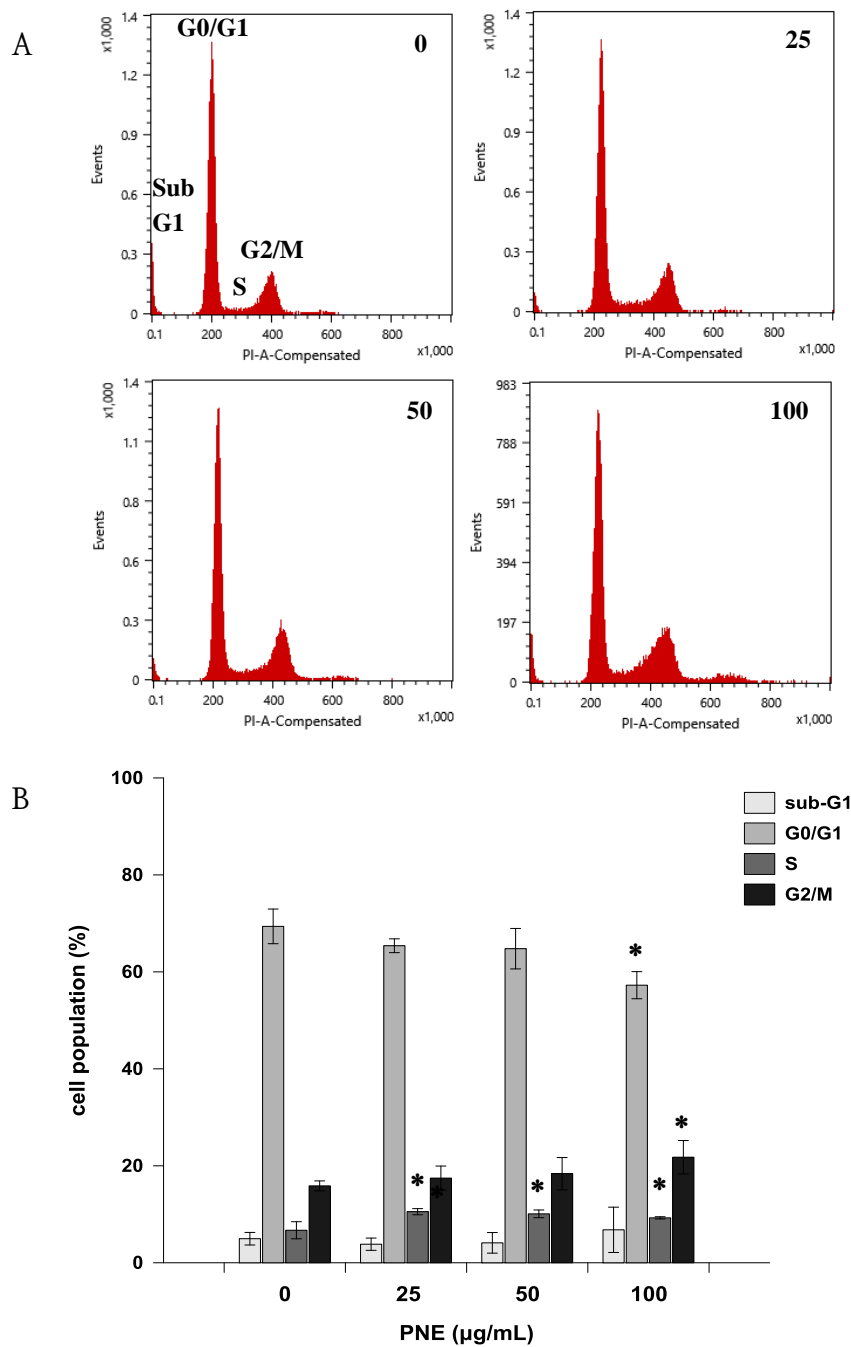


Fig. 14. Flow cytometric DNA content analysis of Hep G2 cells treated with PNE. Hep G2 cells were treated with PNE (0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h and stained with PI (A). The cell cycle was quantified (B). PNE; pine needles extract. An asterisk (*) indicate significant differences in cell cycle compared to the control ($p < 0.05$)

5. NF- κ B activation

Hep G2 cell에 감잎, 녹차잎, 솔잎 처리 후 TNF- α 로 NF- κ B 활성을 유도한 모델을 이용하여 western blot을 통해 NF- κ B의 발현량을 확인하였다. 활성화되어 핵에 존재했을 때 세포 증식 및 세포자가사멸에 관여하는 전사인자인 NF- κ B의 단백질 발현량은 핵에 존재하는 단백질의 일종인 nucleolin의 발현량을 기준으로 획득한 band를 정량하여 결과로 나타내었다.

Hep G2 cell에 감잎을 처리했을 때 (Fig. 15), 처리 농도가 증가함에 따라 NF- κ B 발현량이 감소되는 경향을 보였으나, 100 μ g/mL의 농도에서만 positive con (시료 처리 x, TNF- α 처리 o)과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$).

녹차잎을 Hep G2 cell에 처리했을 때 (Fig. 16)에는 처리 농도가 증가함에 따라 NF- κ B의 발현량이 감소되는 경향을 보였으나, positive con과 비교하였을 때에는 농도 변화와 상관없이 NF- κ B 발현을 유의하게 저해하였다 ($p < 0.05$).

솔잎을 Hep G2 cell에 처리했을 때 (Fig. 17)에는 처리 농도에 상관없이 NF- κ B 발현에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 통해 감잎과 녹차잎은 proteasome의 역가 저해를 통해 Hep G2 cell의 증식 억제, cell cycle arrest 및 NF- κ B의 발현 억제 효과를 나타냈으며, 솔잎은 proteasome 역가 저해를 통한 Hep G2 cell 증식의 억제 및 cell cycle arrest를 유발하였으나, NF- κ B의 발현 저해 효과는 확인할 수 없었다. 하지만 감잎, 녹차잎, 솔잎 모두 proteasome 역가 저해 및 암세포의 증식, cell cycle arrest를 유발한다는 결과를 통해 항암 가능성이 있음을 확인 할 수 있었다.

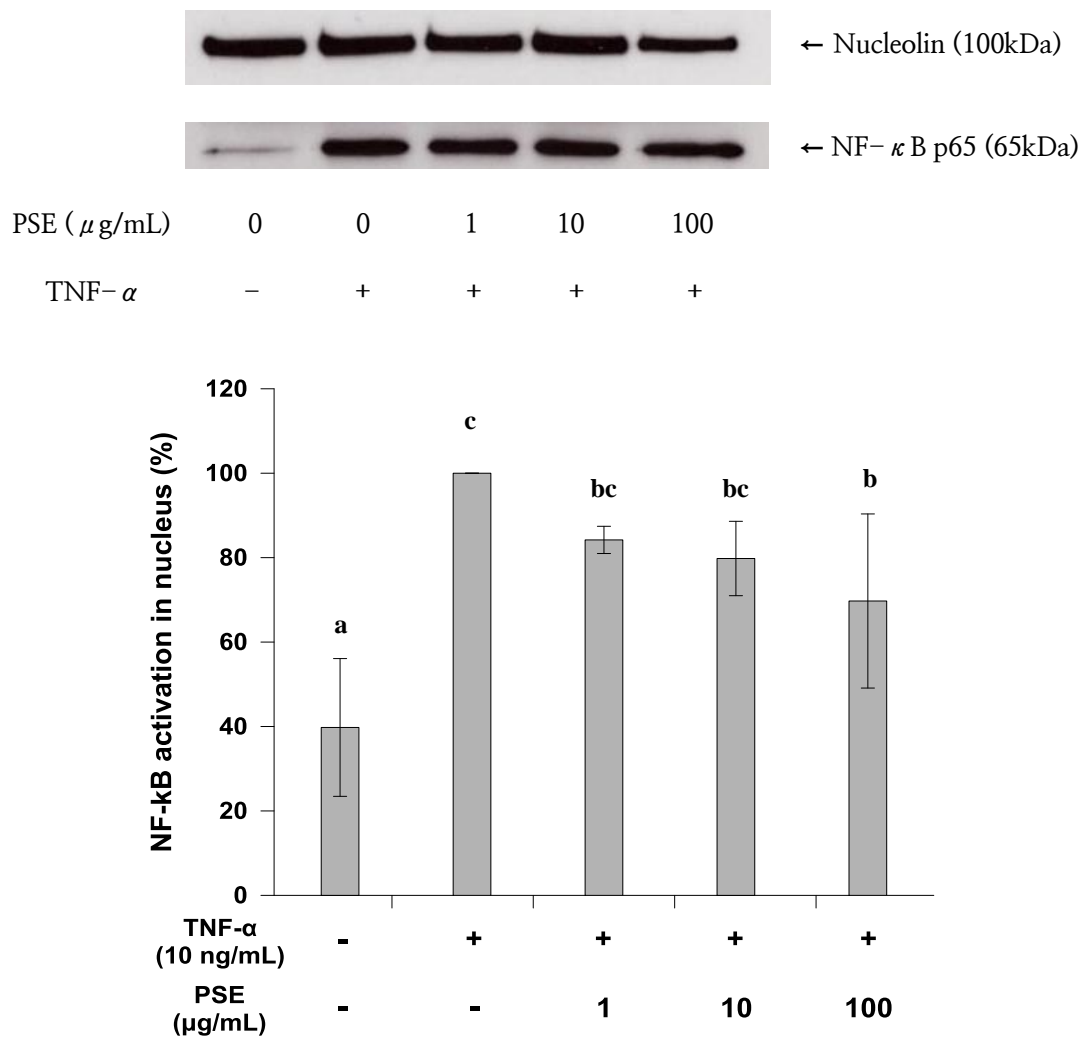


Fig. 15. Effect of PSE on TNF- α -induced NF- κ B activation.

Hep G2 cells were incubated in medium with persimmon leaves extracts (1, 10, 100 μ g/mL) for 24 h followed by TNF- α treatment (10ng/mL) for 30 min. Nuclear extracts were assessed by western blotting using antibody to NF- κ B p65. PSE; persimmon leaves extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

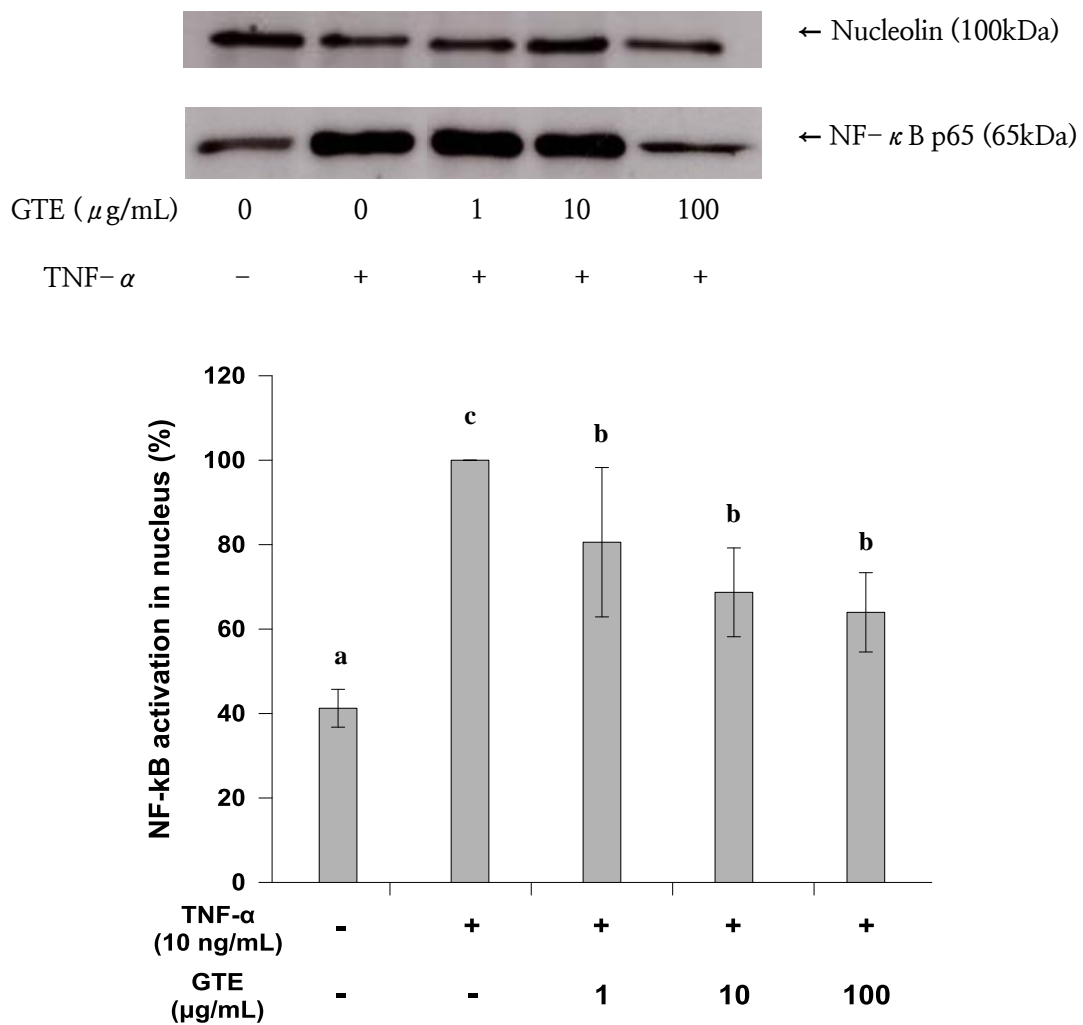


Fig. 16. Effect of GTE on TNF- α -induced NF- κ B activation. Hep G2 cells were incubated in medium with green tea leaves extracts (1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h followed by TNF- α treatment (10ng/mL) for 30 min. Nuclear extracts were assessed by western blotting using antibody to NF- κ B p65. GTE; green tea leaves extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

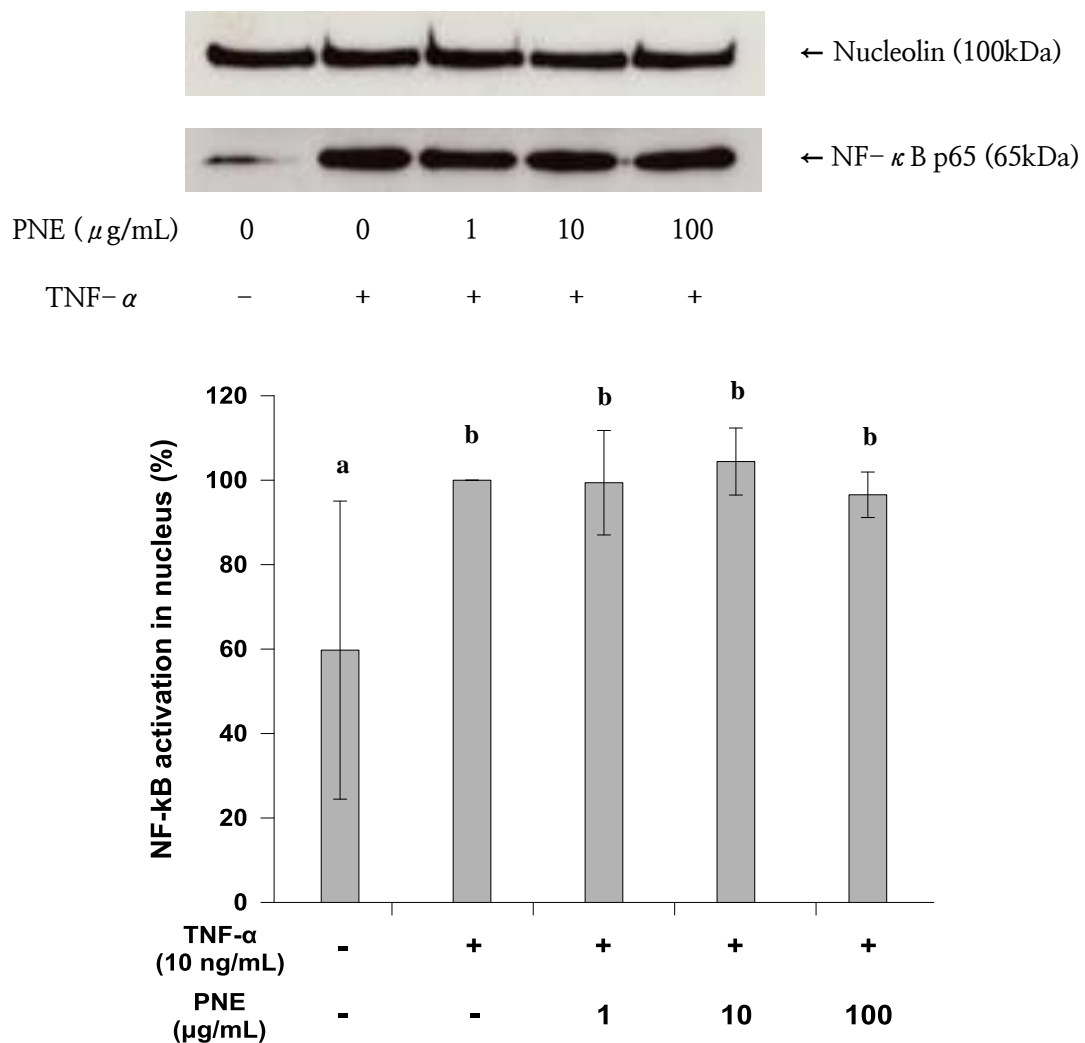


Fig. 17. Effect of PNE on TNF- α -induced NF- κ B activation. Hep G2 cells were incubated in medium with pine needles extracts (1, 10, 100 μ g/mL) for 24 h followed by TNF- α treatment (10ng/mL) for 30 min. Nuclear extracts were assessed by western blotting using antibody to NF- κ B p65. PNE; pine needles tea extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

IV. 결 론

CPA assay를 이용하여 6종류의 차류의 proteasome 역가 저해 활성을 스크리닝한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 감잎, 녹차잎, 솔잎의 proteasome 역가 저해율이 다른 시료들과 비교하여 유의하게 높게 나타났고 ($p < 0.05$), 감잎, 녹차잎, 솔잎을 농도별로 처리하여 proteasome 역가 저해 활성을 측정한 결과, 3가지 시료 모두 proteasome 역가를 농도-의존적으로 저해하였다 ($p < 0.05$). 이는 감잎, 녹차잎, 솔잎에 존재하는 flavonoid와 triterpenoid에 의해 나타난 효과로 생각되며, 감잎, 녹차잎, 솔잎은 향후 잠재적 proteasome 저해제로서 활용이 가능할 것이다.

감잎, 녹차잎, 솔잎을 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 다양한 농도로 Hep G2 cell에 처리하여 세포 독성을 측정한 결과, 시험한 모든 농도에서 세포 독성률이 10 % 미만으로 나타났다. 이는 세 종류의 차잎이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이내의 농도에서 세포에 미치는 독성이 거의 없다고 할 수 있으며, 이 후의 세포 증식 억제에 대한 효과는 독성에 의한 결과가 아님을 의미한다.

감잎, 녹차잎, 솔잎을 세포 독성이 나타나지 않는 농도 범위인 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 다양한 농도로 처리하여 세포 증식 실험을 한 결과, 농도 증가에 따른 세포 증식률 감소 경향을 확인할 수 있었고, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 control (con)과 비교하여 감잎 (75.9 ± 5.1 %), 솔잎 (60.5 ± 8.6 %), 녹차잎 (33.4 ± 1.4 %) 순으로 세포 증식률을 유의하게 감소시켰다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는, 앞서 세

종류의 찻잎의 proteasome 역가 저해 효과를 확인했으므로 세포 증식 억제 효과는 세포 증식 조절과 관련 있는 proteasome 저해에 의한 영향이 있을 것이라 생각된다.

감잎, 녹차잎, 솔잎이 세포주기에 미치는 영향을 분석한 결과, 감잎은 G2/M기를 con에 비해 유의하게 증가시켰으므로 세포 주기 저해 (cell cycle arrest)를 유발하였다 ($p < 0.05$). 녹차잎과 솔잎은 S기를 con에 비해 유의하게 증가시켰으므로 cell cycle arrest를 유발하였다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 즉, 감잎, 녹차잎, 솔잎의 proteasome 역가 저해 효과로 인한 cell cycle과 관련된 단백질의 축적 및 차류에 존재하는 flavonoid에 의해 cell cycle arrest가 발생하였고, cell cycle arrest는 자연히 세포 증식 억제 효과로 이어졌을 것이라 추정된다.

감잎, 녹차잎, 솔잎이 NF- κ B 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 감잎은 100 μ g/mL의 농도에서 con과 비교하여 NF- κ B 발현량을 유의하게 감소시켰다 ($p < 0.05$). 녹차잎은 con과 비교하여 농도 변화와 상관없이 모두 NF- κ B의 발현량을 감소시켰고 ($p < 0.05$), 솔잎은 NF- κ B 발현에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 감잎과 녹차의 NF- κ B 발현 억제는 proteasome 역가 저해에 의한 결과라 생각된다.

따라서, 감잎, 녹차잎, 솔잎이 Hep G2 cell (인간 간암 세포)의 proteasome 역가 저해, 세포 증식 억제, 세포 주기 저해를 유발하고, 감잎과 녹차잎이 NF- κ B 발현을 감소시킨다는 실험 결과를 통해 감잎, 녹차잎, 솔잎의 천연 proteasome 저해제로서의 활용 가능성 및 항암 효과를 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

[1] J. Gautier, J.K. Pal, M.F. Grossi de Sa, J.C. Beetschen, K. Scherrer, Differential cytolocalization of prosomes in axolotl during oogenesis and meiotic maturation, *Journal of cell science*, 90 (Pt 4) (1988) 543–553.

[2] M.F. Grossi de Sa, C. Martins de Sa, F. Harper, M. Olink–Coux, M. Huesca, K. Scherrer, The association of prosomes with some of the intermediate filament networks of the animal cell, *The Journal of cell biology*, 107 (1988) 1517–1530.

[3] J.K. Pal, P. Gounon, M.F. Grossi de Sa, K. Scherrer, Presence and distribution of specific prosome antigens change as a function of embryonic development and tissue–type differentiation in *Pleurodeles waltl*, *Journal of cell science*, 90 (Pt 4) (1988) 555–567.

[4] J.M. Peters, Z. Cejka, J.R. Harris, J.A. Kleinschmidt, W. Baumeister, Structural features of the 26 S proteasome complex, *Journal of molecular biology*, 234 (1993) 932–937.

[5] M. Verdoes, B.I. Florea, G.A. van der Marel, H.S. Overkleeft, Chemical Tools To Study the Proteasome, *European Journal of Organic Chemistry*, 2009 (2009) 3301–3313.

- [6] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H.D. Bartunik, R. Huber, Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature*, 386 (1997) 463–471.
- [7] M. Groll, W. Heinemeyer, S. Jäger, T. Ullrich, M. Bochtler, D.H. Wolf, R. Huber, The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (1999) 10976–10983.
- [8] A. Ciechanover, Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin–proteasome system and onto human diseases and drug targeting, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21 (2013) 3400–3410.
- [9] M.H. Glickman, D.M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V.A. Fried, D. Finley, A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin–conjugate degradation and related to the COP9–signalosome and eIF3, *Cell*, 94 (1998) 615–623.
- [10] A. Hershko, A. Ciechanover, The ubiquitin system, *Annual review of biochemistry*, 67 (1998) 425–479.
- [11] M.H. Glickman, A. Ciechanover, The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiological reviews*, 82 (2002) 373–428.

- [12] J. Myung, K.B. Kim, C.M. Crews, The ubiquitin–proteasome pathway and proteasome inhibitors, *Medicinal research reviews*, 21 (2001) 245–273.
- [13] D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annual review of biochemistry*, 68 (1999) 1015–1068.
- [14] E. Reinstein, A. Ciechanover, Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection, *Annals of internal medicine*, 145 (2006) 676–684.
- [15] A.F. Kisselev, A.L. Goldberg, Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chemistry & biology*, 8 (2001) 739–758.
- [16] G. de Bettignies, O. Coux, Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting, *Biochimie*, 92 (2010) 1530–1545.
- [17] J. Adams, The proteasome: a suitable antineoplastic target, *Nat Rev Cancer*, 4 (2004) 349–360.
- [18] J. Adams, V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, P.J. Elliott, Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer research*, 59 (1999) 2615–2622.

[19] K.R. Landis-Piowar, Proteasome inhibitors in cancer therapy: a novel approach to a ubiquitous problem, *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology*, 25 (2012) 38–44.

[20] L.J. Crawford, B. Walker, H. Ovaa, D. Chauhan, K.C. Anderson, T.C. Morris, A.E. Irvine, Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132, *Cancer research*, 66 (2006) 6379–6386.

[21] S. Tsubuki, Y. Saito, M. Tomioka, H. Ito, S. Kawashima, Differential Inhibition of Calpain and Proteasome Activities by Peptidyl Aldehydes of Di-Leucine and Tri-Leucine, *The Journal of Biochemistry*, 119 (1996) 572–576.

[22] A.L. Goldberg, Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs, *The Journal of cell biology*, 199 (2012) 583–588.

[23] D.J. Kuhn, Q. Chen, P.M. Voorhees, J.S. Strader, K.D. Shenk, C.M. Sun, S.D. Demo, M.K. Bennett, F.W.B. van Leeuwen, A.A. Chanan-Khan, R.Z. Orlowski, Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma, *Blood*, 110 (2007) 3281–3290.

[24] A.V. Singh, M.A. Palladino, G.K. Lloyd, B. Potts, D. Chauhan, K.C. Anderson, Pharmacodynamic and Efficacy Studies of the Novel Proteasome

Inhibitor NPI-0052 (marizomib) in a Human Plasmacytoma Xenograft Murine Model, *British journal of haematology*, 149 (2010) 550–559.

[25] D. Chauhan, L. Catley, G. Li, K. Podar, T. Hideshima, M. Velankar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, H. Yasui, A. Letai, H. Ova, C. Berkers, B. Nicholson, T.H. Chao, S.T.C. Neuteboom, P. Richardson, M.A. Palladino, K.C. Anderson, A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib, *Cancer Cell*, 8 (2005) 407–419.

[26] S. Omura, K. Matsuzaki, T. Fujimoto, K. Kosuge, T. Furuya, S. Fujita, A. Nakagawa, Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells, *The Journal of antibiotics*, 44 (1991) 117–118.

[27] G. Fenteany, R. Standaert, W. Lane, S. Choi, E. Corey, S. Schreiber, Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin, *Science*, 268 (1995) 726–731.

[28] H. Yang, K.R. Landis-Piwowar, D. Chen, V. Milacic, Q.P. Dou, Natural compounds with proteasome inhibitory activity for cancer prevention and treatment, *Current protein & peptide science*, 9 (2008) 227–239.

[29] R.F. Place, E.J. Noonan, C. Giardina, HDAC inhibition prevents NF- κ B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome

subunit expression stabilizes I kappa B alpha, *Biochemical pharmacology*, 70 (2005) 394–406.

[30] R.H. Liu, J. Finley, Potential cell culture models for antioxidant research, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (2005) 4311–4314.

[31] K.L. Wolfe, R.H. Liu, Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (2007) 8896–8907.

[32] Y. Zheng, X. Jiang, F. Gao, J. Song, J. Sun, L. Wang, X. Sun, Z. Lu, H. Zhang, Identification of plant-derived natural products as potential inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome, *BMC complementary and alternative medicine*, 14 (2014) 400.

[33] P.I. Oteiza, A.G. Erlejman, S.V. Verstraeten, C.L. Keen, C.G. Fraga, Flavonoid–membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface?, *Clinical and Developmental Immunology*, 12 (2005) 19–25.

[34] C. Sanchez–Martinez, L.M. Gelbert, M.J. Lallena, A. de Dios, Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25 (2015) 3420–3435.

[35] K.A. Schafer, The cell cycle: a review, *Vet Pathol*, 35 (1998) 461–478.

- [36] M. Glotzer, A.W. Murray, M.W. Kirschner, Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway, *Nature*, 349 (1991) 132–138.
- [37] V. Bours, M. Bentires-Alj, A.-C. Hellin, P. Viatour, P. Robe, S. Delhalle, V. Benoit, M.-P. Merville, Nuclear factor- κ B, cancer, and apoptosis, *Biochemical pharmacology*, 60 (2000) 1085–1089.
- [38] T. Dorai, B.B. Aggarwal, Role of chemopreventive agents in cancer therapy, *Cancer Letters*, 215 (2004) 129–140.
- [39] B.B. Aggarwal, Nuclear factor- κ B: The enemy within, *Cancer Cell*, 6 (2004) 203–208.
- [40] H.L. Pahl, Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors, *Oncogene*, 18 (1999) 6853–6866.
- [41] M.J. May, S. Ghosh, Signal transduction through NF- κ B, *Immunology Today*, 19 (1998) 80–88.
- [42] Z. Sun, R. Andersson, NF- κ B activation and inhibition: a review, *Shock (Augusta, Ga.)*, 18 (2002) 99–106.
- [43] H. Yoon, R.H. Liu, Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF- κ B activation in human breast cancer MCF-7 cells, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (2007) 3167–3173.

- [44] U.V. Mallavadhani, A.K. Panda, Y.R. Rao, Review article number 134 pharmacology and chemotaxonomy of diospyros, *Phytochemistry*, 49 (1998) 901–951.
- [45] J. Duan, Y. Zheng, Q. Dong, J. Fang, Structural analysis of a pectic polysaccharide from the leaves of *Diospyros kaki*, *Phytochemistry*, 65 (2004) 609–615.
- [46] S. Funayama, H. Hikino, Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 27 (1979) 2865–2868.
- [47] P.T. Thuong, C.H. Lee, T.T. Dao, P.H. Nguyen, W.G. Kim, S.J. Lee, W.K. Oh, Triterpenoids from the leaves of *Diospyros kaki* (persimmon) and their inhibitory effects on protein tyrosine phosphatase 1B, *J Nat Prod*, 71 (2008) 1775–1778.
- [48] S.H. Moon, K.H. Kim, K.Y. Park, Antitumor effect of persimmon leaves in vivo using sarcoma-180 cells, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 25 (1996) 865–870.
- [49] S.Y. Kim, S.M. Jeong, S.J. Kim, K.I. Jeon, E. Park, H.R. Park, S.C. Lee, Effect of heat treatment on the antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) peel, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70 (2006) 999–1002.

[50] S.H. Moon, J.O. Kim, S.H. Rhee, K.Y. Park, K.H. Kim, T.H. Rhew, Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 22 (1993) 307–312.

[51] S.H. Moon, K.Y. Park, Antimutagenic effects of boiled water extract and tannin from persimmon leaves, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 24 (1995) 880–886.

[52] K. Kameda, T. Takaku, H. Okuda, Y. Kimura, T. Okuda, T. Hatano, I. Agata, S. Arichi, Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity, *J Nat Prod*, 50 (1987) 680–683.

[53] H. Umekawa, Y. Takada, Y. Furuichi, T. Takahashi, Y. Achiwa, T. Komiya, S. Yoshida, Inhibition of eukaryotic dna polymerase alpha by persimmon (*Diospyros kaki*) extract and related polyphenols, *Biochemistry and molecular biology international*, 47 (1999) 795–801.

[54] B. Frei, J.V. Higdon, Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, *The Journal of nutrition*, 133 (2003) 3275s–3284s.

[55] S. Sae-tan, K.A. Grove, J.D. Lambert, Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea, *Pharmacological Research*, 64 (2011) 146–154.

- [56] Y. Xu, M. Zhang, T. Wu, S. Dai, J. Xu, Z. Zhou, The anti-obesity effect of green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high-fat diet, *Food & Function*, 6 (2015) 296–303.
- [57] C.C. Chou, L.L. Lin, K.T. Chung, Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season, *International journal of food microbiology*, 48 (1999) 125–130.
- [58] B.H. Ryu, C.O. Park, Antioxidant effect of green tea extracts on enzymatic activities of hairless mice skin induced by ultraviolet B light, *Korean journal of food science and technology*, 29 (1997) 355–361.
- [59] K. Muramatsu, M. Fukuyo, Y. Hara, Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats, *Journal of nutritional science and vitaminology*, 32 (1986) 613–622.
- [60] A.H. Lee, M.L. Fraser, X. Meng, C.W. Binns, Protective effects of green tea against prostate cancer, *Expert review of anticancer therapy*, 6 (2006) 507–513.
- [61] C.S. Kwak, S.C. Moon, M.S. Lee, Antioxidant, Antimutagenic, and Antitumor Effects of Pine Needles (*Pinus densiflora*), *Nutrition and Cancer*, 56 (2006) 162–171.
- [62] Y.H. Kang, Y.K. Park, S.R. Oh, K.D. Moon, Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts, *Korean journal of food science and technology*, 27 (1995) 978–984.

[63] Y.H. Kang, Y.K. Park, T.Y. Ha, K.D. Moon, Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 25 (1996) 367–373.

[64] Y.H. Lee, Y.S. Choi, S.Y. Lee, The Cholesterol-lowering effects of the extract from *Pinus strubus* in chickens, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 25 (1996) 188–192.

[65] Z. Kong, Z. Liu, B. Ding, Study on the antimutagenic effect of pine needle extract, *Mutation research*, 347 (1995) 101–104.

[66] K.N. Park, S.H. Lee, Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of *Vibrio*, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 32 (2003) 185–190.

[67] Y.J. Chung, M.W. Bae, M.I. Chung, J.S. Lee, K.S. Chung, Cytotoxic effect of the distilled pine-needle extracts on several cancer cell lines in vitro, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31 (2002) 691–695.

[68] J. Sun, Y.F. Chu, X. Wu, R.H. Liu, Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (2002) 7449–7454.

[69] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1983) 55–63.

[70] M. Liu, X.Q. Li, C. Weber, C.Y. Lee, J. Brown, R.H. Liu, Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (2002) 2926–2930.

[71] Z. Darzynkiewicz, G. Juan, DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis, *Current protocols in cytometry / editorial board*, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.], Chapter 7 (2001) Unit 7.5.

[72] E. Pozo-Guisado, J.M. Merino, S. Mulero-Navarro, M.J. Lorenzo-Benayas, F. Centeno, A. Alvarez-Barrientos, P.M. Fernandez-Salguero, Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 115 (2005) 74–84.

[73] H. Nakajima, H. Nagaso, N. Kakui, M. Ishikawa, T. Hiranuma, S. Hoshiko, Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 42774–42786.

[74] Y.M. Janssen, C.K. Sen, Nuclear factor kappa B activity in response to oxidants and antioxidants, *Methods in enzymology*, 300 (1999) 363–374.

[75] M.P. Kähkönen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (1999) 3954–3962.

[76] X.H. Zhang, Z.Q. Zou, C.W. Xu, Y.Z. Shen, D. Li, Myricetin induces G2/M phase arrest in HepG2 cells by inhibiting the activity of the cyclin B/Cdc2 complex, *Molecular medicine reports*, 4 (2011) 273–277.

[77] H.J. Cho, J.H. Park, Kaempferol Induces Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells, *Journal of cancer prevention*, 18 (2013) 257–263.

[78] X. Shen, Y. Zhang, Y. Feng, L. Zhang, J. Li, Y.A. Xie, X. Luo, Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell growth, induces apoptosis and causes S phase arrest in hepatocellular carcinoma by suppressing the AKT pathway, *International journal of oncology*, 44 (2014) 791–796.

[79] Y.T. Deng, J.K. Lin, EGCG inhibits the invasion of highly invasive CL1-5 lung cancer cells through suppressing MMP-2 expression via JNK signaling and induces G2/M arrest, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (2011) 13318–13327.

[80] H. Zhang, M. Zhang, L. Yu, Y. Zhao, N. He, X. Yang, Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50 (2012) 1589–1599.

[81] K. Bishayee, S. Ghosh, A. Mukherjee, R. Sadhukhan, J. Mondal, A.R. Khuda-Bukhsh, Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation

to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma:
signal cascade and drug-DNA interaction, Cell proliferation, 46 (2013) 153-163.

ABSTRACT

Development of Cellular Proteasome Activity (CPA) Assay and Anti-cancer Effects of Tea Leaves Extracts

Kim, Soyoung

Department of Food and Nutrition

Graduate school of

Sungshin University

Proteasome is an intracellular protease, which controls cellular processes by degrading regulatory proteins associated with cell cycle, signal transduction, gene expression, and apoptosis. Also, proteasome stimulates activation of NF- κ B by degrading ubiquitinated I κ B- α . NF- κ B regulates cell proliferation as a transcription factor. Thus inhibition of proteasome activity can contribute to prevention of cancer. The purposes of this study were to develop cellular proteasome activity (CPA) assay, to evaluate the proteasome inhibition activities (PIAs) of selected tea leaves extracts: green tea leaves extract (GTE), persimmon leaves extract (PSE), and pine needles extract (PNE), to evaluate the effects on cell

proliferation, cell cycle, and activation of NF- κ B on hepatocarcinoma cell, and finally to suggest potential anti-cancer effect. PIAs of GTE, PSE, and PNE using the CPA assay were significantly increased in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). Also, GTE, PSE and PNE inhibited cell proliferation, as GTE (33.4 ± 1.4 %) significantly had the lowest cell proliferation rate ($p < 0.05$), followed by PNE (60.5 ± 8.6 %), PSE (75.9 ± 5.1 %) at $100 \mu\text{g/mL}$. Also, GTE, PSE, and PNE significantly induced S, G2/M, and S phase arrest, respectively ($p < 0.05$). Also, GTE (at the concentration of 1, 10, $100 \mu\text{g/mL}$) and PSE (at the concentration of $100 \mu\text{g/mL}$) significantly inhibited activation of NF- κ B ($p < 0.05$). Therefore, GTE, PSE and PNE act as proteasome inhibitors and may have anti-cancer effects by inhibition of cancer cell proliferation, cell cycle, and activation of NF- κ B.